

Einfluß von modifizierten Nucleosiden
in Transfer-RNA auf die Genauigkeit
der Proteinsynthese und den
Metabolismus von tRNA

von
Hans-Gisbert Ott
aus Ansbach

Diss. Erlangen
1984

1984 № 106



Einfluß von modifizierten Nucleosiden in Transfer-RNA auf die Genauigkeit der Proteinsynthese und den Metabolismus von tRNA

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Hans-Gisbert Ott
aus Ansbach

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung:

14. Februar 1984

Vorsitzender der Promotionskommission: Professor Dr. K. Jacobs

Erstberichterstatte: Professor Dr. H. Kersten

Zweitberichterstatte: Professor Dr. H.G. Gassen

Die vorliegende Arbeit wurde bei Frau Prof. Dr. H. Kersten
- Arbeitsgruppe Biochemie -
Fachbereich Biologie/Chemie
an der Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin
1 A ₂₆₀	ist die Menge eines Stoffes in 1 ml Lösung, die bei einer Wellenlänge von 260 nm und einem Lichtweg von 1 cm die Absorption 1 zeigt (= 1,8 nmol od. 45µg tRNA).
Ac	Acetat
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
β-ME	β-Mercapto-Ethanol
C	Cytidin
Ci	Curie
cpm	Impulse pro Minute
D	Dihydrouridin
2D	zweidimensional
DC	Dünnschichtchromatogramm
DEAE-Cellulose	Diethylaminoethyl-Cellulose
Dimethyl-POPOP	1,4-Di-(2-(4-methyl-5-phenyl-oxazolyl))-benzol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EF _G	Elongationsfaktor G
EF _{Tu}	Elongationsfaktor Tu
fMet	Formyl-Methionin
G	Guanosin
His	Histidin
IF ₂	Initiationsfaktor 2
M	molar
m ⁵ C	5-Methyl-Cytidin
m ¹ G	1-Methyl-Guanosin
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
Ø	Pseudouridin
PAA	Polyacrylamid
Phe	Phenylalanin
poly(A)	Polyadenylsäure
poly(Lys)	Polylysin

poly(Phe)	Polyphenylalanin
poly(U)	Polyuridylsäure
ppGpp	Guanosintetraphosphat (Guanosin-5'-diphosphat-3'-diphosphat)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
Q	Queuosin (7- {[4,5-cis-Dihydroxy-2-cyclopenten-1-yl)- amino]methyl}-7-deazaguanosin)
Q*	Glycosylierte Derivate von Queuosin
rel ⁺ /rel ⁻	Genotyp (E. coli): Stamm mit/ohne strenge Kontrolle der Protein- und RNA-Synthese
RNAase	Ribonuclease
RPC	Reverse-Phasen-Chromatographie
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
S-100	Überstand einer Zentrifugation mit 100 000 g
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
T	Ribosylthymine
TCA	Trichloressigsäure
tgt ⁺ /tgt ⁻	Genotyp (E. coli): Stamm mit/ohne tRNA-Guanin- Transglycosylase
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
trmA ⁺ /trmA ⁻	Genotyp (E. coli): Stamm mit/ohne tRNA-Uracil- 5-Methyltransferase
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
Tyr	Tyrosin
U	Uridin



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

<u>Zusammenfassung</u>	1
<u>Einleitung</u>	4
<u>Teil A: Ribosylthymidin in Eubakterien</u>	7
A.0. Einleitung: Ribosylthymidin	7
A.1. Material und Methoden	10
A.1.1. Material und Geräte	10
A.1.2. Bakterienstämme und Wachstumsbedingungen	12
1. Escherichia coli	13
2. Bacillus subtilis	14
A.1.3. Aminosäuremangelbedingungen	15
1. Histidinmangel	15
2. Isoleucinmangel	15
3. Methioninmangel	16
A.1.4. Radioaktive Markierung von Zellkomponenten	16
1. Bestimmung der Syntheserate von Protein und RNA	16
2. Markierung von Zellprotein zur Gelelektrophorese	17
A.1.5. 2-Dimensionale Gelelektrophorese von Proteinen	17
1. Aufschluß der Zellen	18
2. Analyse der Proben	19
3. Elektrophoretische Trennung der Proteine	19
4. Detektion der aufgetrennten Proteine	20
A.2. Ergebnisse	21
A.2.1. Wachstum der Bakterienstämme	21
A.2.2. Proteinmuster von E. coli trmA ⁺ und trmA ⁻ in der stationären Phase	23
1. Vergleich der Stämme E. coli CP79 (T54) und IB5 (U54)	24
2. Vergleich des Transduktantenpaares GB1-5-41relA (T54) und GB1-5-753relA (U54)	24

A.2.3.	Einfluß von Ribosylthymine auf die Genauigkeit der Elongation der Proteinsynthese in intakten Zellen	27
1.	Nachweis von Fehlern bei der Proteinsynthese unter Histidinmangel in den rel^- -Stämmen E. coli CP79 und IB5	28
2.	Theorie der unter Aminosäuremangel erhöhten Elongationsfehler in E. coli rel^-	30
3.	Definierter Histidinmangel in E. coli rel^-	31
4.	"Stuttering" in E. coli CP79 (T54) und IB5 (U54) bei definiertem Histidinmangel	33
	Anhang: Stuttering in B. subtilis rel^+	35
A.2.4.	Die Modifikation Ribosylthymine und die strenge Kontrolle der Protein- und RNA-Synthese in Eubakterien	36
1.	Einfluß von Ribosylthymine auf die Hemmbarkeit der Gesamtsynthese von Protein und RNA durch Aminosäuremangel in rel^+ -Stämmen	37
2.	Relative Syntheseraten der Proteine in E. coli $trmA^+$ und $trmA^-$ bei Isoleucinmangel	39
A.3.	Diskussion	41
A.4.	Anhang zur Diskussion (Formeln und Ergebnistabellen)	52
<u>Teil B: Queuosin in Dictyostelium discoideum</u>		55
B.0.	Einleitung: Queuosin und seine Derivate	55
B.1.	Material und Methoden	58
B.1.1.	Material und Geräte	58
B.1.2.	Züchtung von Dictyostelium discoideum	59
1.	D. discoideum AX-2	60
2.	D. discoideum NC-4	62
B.1.3.	Markierung der Zellen mit ^{32}P -Orthophosphat	62
B.1.4.	Hemmung der zellulären RNA-Synthese	63
B.1.5.	Präparation und Reinigung von tRNA	63
B.1.6.	Präparation eines tRNA-freien S-100 aus D. discoideum AX-2	63
B.1.7.	Aminoacylierung von tRNA und RPC-5-Chromatographie	64
B.1.8.	tRNA-Transglycosylase-Reaktionen	65
B.1.9.	2-Dimensionale Gelelektrophorese von tRNA	66
1.	Elektrophoretische Trennung	66
2.	Detektion und Quantifizierung der tRNAs	67
3.	Extraktion und Analyse der tRNAs	68

B.2. Ergebnisse	69
B.2.1. D. discoideum: Ein Modellsystem zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von Queuin und der Q-Familie der tRNAs	69
1. Züchtung von D. discoideum AX-2 in einem Q-freien Medium	70
2. Das Auftreten von Q-haltigen tRNAs in D. discoideum in Abhängigkeit vom Medium	72
3. Quantitative Bestimmung der Q-defizienten tRNAs in D. discoideum in Abhängigkeit vom Medium	75
B.2.2. Die tRNA-Queuin:Guanin-Transglycosylase aus D. discoideum in vitro	77
1. Nachweis der tRNA-Transglycosylase in S-100-Extrakten aus D. discoideum AX-2	78
2. Verfahren zur Messung des Einbaus von Queuin in Q-defiziente tRNAs	80
3. Eigenschaften der tRNA-Transglycosylase in Gesamtextrakten aus D. discoideum	81
B.2.3. Erhöhter Turnover von tRNAs, die an Position 34 Guanosin anstelle von Queuosin-Derivaten tragen	85
1. Aminoacylierbarkeit der tRNAs aus D. discoideum in Abhängigkeit vom Queuingehalt des Mediums	86
2. Quantifizierung der in vivo mit ^{32}P markierten tRNAs aus D. discoideum nach Trennung über 2D-Gelelektrophorese	90
3. Charakterisierung der Q*-Derivate in D. discoideum AX-2	97
4. Bestimmung der intrazellulären Stabilität der tRNAs der Q-Familie in D. discoideum AX-2	100
B.3. Diskussion	106
<u>Literatur</u>	113

ZUSAMMENFASSUNG

Modifizierte Nucleoside in Transfer-Ribonucleinsäuren beeinflussen (i) die Geschwindigkeit und die Genauigkeit der Proteinsynthese und sind (ii) an regulatorischen Prozessen beteiligt. Nach einer zusammenfassenden Hypothese (Kersten et al., 1983) wurden tRNA-Modifikationen primär zur Regulation entwickelt; die Proteinsynthesemaschinerie hat sich parallel dazu entwickelt und angepaßt.

Die Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit waren der Einfluß von Ribosylthymine auf die Genauigkeit der Proteinsynthese in *E. coli* (Teil A) und die Funktion von Queuosin beim tRNA-Metabolismus im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (Teil B).

A. Ribosylthymine in Eubakterien

Ribosylthymine wird in allen tRNAs von Eubakterien an Position 54 in der Sequenz T ψ CG gefunden. Es wird angenommen, daß dieser Bereich der tRNA bei der Bindung an das Ribosom beteiligt ist. Mutanten von *E. coli*, denen die tRNA-Uracil-5-Methyltransferase fehlt ($trmA^-$), werden in Mischkulturen vom Wildtyp ($trmA^+$) überwachsen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die relativen Mengen etwa eines Viertels aller Proteine aus $trmA^+$ - und $trmA^-$ -Stämmen vom Ende des logarithmischen Wachstums bis zur 24 Stunden stationären Phase nach 2D-Gelelektrophorese verglichen. Es ergaben sich keine Hinweise auf Veränderungen im zellulären Gehalt einzelner Enzymsysteme, die für den Überlebensvorteil des Wildtyps verantwortlich sein könnten.

Da Ergebnisse unseres Arbeitskreises gezeigt hatten, daß ein Fehlen von Ribosylthymine die Genauigkeit der Polyphenylalaninsynthese in vitro erniedrigt, wurde die Genauigkeit der Proteinsynthese in intakten Zellen von *E. coli* $trmA^+$ und $trmA^-$ untersucht. Die Fehlerrate beim Lesen der Histidincodons CAU und CAC durch tRNA^{Gln} wurde bei verschiedenen definierten intrazellulären Histidinspiegeln in *E. coli*-Stämmen his^- , rel^- mit U54 und T54 verglichen. Die An- bzw. Abwesenheit von Ribosylthymine beeinflußt das Ausmaß des Glutaminfehleinsbaus in intakten Zellen nicht.

In streng kontrollierten Stämmen *E. coli* $trmA^+$ und $trmA^-$ wurde die Genexpression bei Isoleucinmangel untersucht: Die Zellen wurden mit ³⁵S-Methionin markiert und die Proteine durch 2D-Gelelektrophorese

getrennt. Ein Fehlen der Modifikation Ribosylthymine verändert die Synthese von keinem der mehr als 500 untersuchten Proteine während der durch den Aminosäuremangel ausgelösten "Stringent Response".

Bisher wurden von unserem Arbeitskreis folgende Einflüsse der Methylierung des Uridin 54 auf die Proteinsynthese in vitro gefunden:

- Die Effizienz von tRNA^{Lys} im poly(A)-System wird vermindert.
- Die Effizienz von tRNA^{Phe} im poly(U)-System wird erhöht.
- Die Genauigkeit im poly(U)-System wird erhöht (tRNA^{Phe} , $\text{tRNA}_4^{\text{Leu}}$).

Zur Diskussion wurde ein Modell errechnet, das diese zum Teil gegensätzlichen Effekte durch zwei weitere Ergebnisse unseres Arbeitskreises erklären kann. Das Modell basiert auf folgenden Annahmen:

- (i) Für alle tRNAs einheitlich, erhöht die Anwesenheit von Ribosylthymine die Energie, die bei Bindung der tRNA in die ribosomale A-Seite frei wird.
- (ii) Abhängig von der jeweiligen tRNA-Spezies werden jedoch auch die codoninduzierten Konformationsänderungen der tRNA bei der Bindung in die ribosomale A-Seite erschwert, d.h. Energie, die hierfür aufgebracht werden muß, erhöht sich ebenfalls.

B. Queuosin in D. discoideum

Das 7-Deazaguanosin-Derivat Queuosin kommt an der ersten Position des Anticodons von tRNA^{Asn} , tRNA^{Asp} , tRNA^{His} und tRNA^{Tyr} vor ("Q-Familie" der tRNAs). In Eukaryonten werden diese tRNAs durch das Enzym tRNA-Queuin:Guanin-Transglycosylase modifiziert, das Guanin 34 gegen Queuin austauscht. Für Queuosin wird eine Beteiligung an Differenzierungsvorgängen diskutiert; bislang gab es jedoch kein geeignetes, einfaches Modellsystem zur Untersuchung dieser Frage.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß der Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* Queuin nicht selbst synthetisieren kann: Zellen, die im pepton- und damit Q-freien Medium gezüchtet wurden, enthalten nur Q-defiziente tRNAs. Bereits bei Zusatz von 10^{-7} M Queuin zum Medium werden die tRNAs praktisch vollständig bezüglich Q modifiziert (<2,5% Q-defiziente tRNAs). (In seiner natürlichen Umgebung wird *D. discoideum* von den Bakterien als seiner Nahrungsquelle ausreichend mit Q versorgt (<8% Q-defiziente tRNAs).)

D. discoideum kann somit als Modellsystem zur Untersuchung der funktionellen Rolle von Queuin und der Q-Familie der tRNAs verwendet werden.

Die tRNA-Queuin:Guanin-Transglycosylase aus *D. discoideum* wurde in vitro nachgewiesen und charakterisiert (Test: Freisetzung von ^3H -Guanin aus spezifisch an Position 34 mit Hilfe des *E. coli*-Enzyms markierter tRNA). Die tRNA-Transglycosylase aus *D. discoideum* besitzt eine einzigartig hohe Substratspezifität: Im Gegensatz zu allen bisher untersuchten tRNA-Transglycosylasen wird Guanin 34 nur gegen Queuin und nicht gegen Guanin ausgetauscht. Der K_m -Wert für Queuin beträgt 1×10^{-7} M.

Im erstellten Modellsystem - Q-frei und in Gegenwart von Queuin gezüchteter *D. discoideum* AX-2 - wurde der Einfluß von Q auf die Spiegel spezifischer tRNAs während des logarithmischen Wachstums untersucht. Eine Bestimmung der Aminoacylierbarkeit von Gesamt-tRNA zeigte, daß die zellulären Mengen der für Asp und Tyr spezifischen tRNAs bis auf das Doppelte erhöht sind, wenn dem Medium 10^{-7} M Queuin zugesetzt wird, während die Spiegel von tRNA^{Asn} und tRNA^{His} unverändert bleiben. Der Anstieg von tRNA^{Asp} wurde durch Markierung der Zellen mit ^{32}P -Orthophosphat und Quantifizierung der spezifischen tRNA nach 2D-Gelelektrophorese bestätigt.

(Q+)tRNA^{Asp} und (Q+)tRNA^{Tyr} enthalten hypermodifizierte Derivate von Q (Q*). In gereinigter (Q+)tRNA^{Asp} wurde ein neues, bisher unidentifiziertes Derivat von Q gefunden.

Nach einer Hemmung der RNA-Synthese in logarithmisch gewachsenen Zellen durch Actinomycin C konnte gezeigt werden, daß (Q+)tRNA^{Asp} und (Q+)tRNA^{Tyr} intrazellulär deutlich langsamer abgebaut werden als die entsprechenden G-haltigen tRNAs. Die Stabilität von tRNA^{Asn} und tRNA^{His}, in denen Q nicht hypermodifiziert ist, wird durch die Anwesenheit von Queuin nicht verändert.

Veränderungen des zellulären Gehaltes von Q-defizienter tRNA^{Asp} und tRNA^{Tyr} könnten regulatorische Funktion haben, da für (G34)tRNA^{Tyr} aus *Drosophila* gezeigt wurde, daß sie im Gegensatz zur Q-haltigen tRNA ein Stopp-Codon in TMV-RNA supprimieren kann (Bienz und Kubli, 1981).

EINLEITUNG

Neben Adenosin (A), Cytidin (C), Guanosin (G) und Uridin (U) enthalten die Transfer-Ribonucleinsäuren aller Organismen noch zahlreiche posttranskriptional "modifizierte" Nucleoside.

Je höher ein Organismus in der Evolution steht, desto höher ist der Gehalt seiner tRNAs an diesen Verbindungen: Während in *E. coli* nur etwa 5% aller Nucleoside modifiziert sind, wird in Eukaryonten ein Anteil von bis zu 20% gefunden (vgl. Gauss und Sprinzl, 1983).

Zunächst konzentrierte sich die Forschung auf die Struktur, die Biosynthese und die Verbreitung dieser Verbindungen. Unsere Arbeitsgruppe hatte wesentlichen Anteil an der Aufklärung der Struktur und Biosynthese von 5-Methoxyuridin (Albani et al., 1976; Murao et al., 1978) und an der Untersuchung der Verbreitung von Ribosylthymine (Schmidt et al., 1977a). Die Biosynthese von Ribosylthymine weist eine Besonderheit auf: Während in *E. coli* und in Eukaryonten die an Position 5 eingeführte Methylgruppe aus S-Adenosylmethionin stammt (SAM-abhängiger Weg: Mandel und Borek, 1963), dient in grampositiven Bakterien Folat als Überträger (Kersten et al., 1975).

In den letzten Jahren ist zunehmend die Frage nach der Funktion der modifizierten Nucleoside in den Vordergrund gerückt. Die Diskussion konzentriert sich hierbei im wesentlichen auf zwei mögliche Antworten:

- (i) Modifizierte Nucleoside dienen der Erhöhung der Genauigkeit oder der Geschwindigkeit der Proteinbiosynthese.
- (ii) Die Modifikation einzelner Nucleoside hat regulatorische Bedeutung.

Die ursprüngliche Ansicht, daß das Leseverhalten einer tRNA nur von den Basen in der Anticodon-Region bestimmt wird, wurde durch eine von Hirsh (1971) isolierte Suppressormutante von *E. coli* widerlegt: Die Fähigkeit der tRNA^{Trp} dieser Mutante ein UGA-Stoppocodon zu lesen, beruht darauf, daß sie an Position 24 im Dihydrouridinstamm ein A anstelle eines Guanosins trägt. (Neuere Arbeiten mit Suppressorstämmen von Hefe zeigen, daß mindestens jeder vierte mögliche Basenaustausch die Funktion einer tRNA bei der Proteinsynthese entscheidend verändert (Allison et al., 1983).)

Zur Untersuchung ihres Einflusses auf die Genauigkeit und Geschwindigkeit der Translation, bieten sich besonders Modifikationen an, die evolutionär sehr alt sind, da bei diesen zu erwarten ist, daß sich die Proteinsynthesemaschinerie bereits optimal angepaßt hat. Falls die Genauigkeit der Translation wesentlich durch die betrachtete Modifikation beeinflusst wird, sollten die tRNAs in dieser Beziehung stets voll modifiziert sein.

Eine Modifikation, die diese Anforderungen erfüllt, ist in Eubakterien Ribosylthymine an Position 54 der tRNAs. Da in-vitro-Systeme von *E. coli* relativ einfach zu handhaben sind, und von der genetischen Seite her bei diesem Organismus optimale Voraussetzungen vorliegen, um die für Versuche mit intakten Zellen notwendigen Mutanten zu erhalten, bietet er sich für diese Fragestellung besonders an.

Die einzige tRNA-Modifikation, für die eine regulatorische Funktion nachgewiesen wurde, ist N⁶-Isopentenyl-Adenosin (i⁶A) in *E. coli* (Buck und Griffiths, 1982). Bei Eisenmangel unterbleibt die Methylthiolierung zu 2-Methylthio-N⁶-isopentenyladenosin (ms^{2,i6}A). Die Folge davon ist eine verringerte Attenuation bei der Expression aromatischer Aminosäureoperons (Phe, Trp) und damit eine vermehrte Synthese der Ausgangsstoffe für den Eisenchelator Enterochelin.

In unserem Arbeitskreis wird das 7-Deazaguanosinderivat Queuosin (Q), für das eine Beteiligung an Differenzierungsvorgängen diskutiert wird (Übersicht: Nishimura, 1983), am Schleimpilz Dictyostelium discoideum untersucht. *D. discoideum* ist ein gut eingeführtes, einfaches Modellsystem für Differenzierungsprozesse; er durchläuft bei Nahrungsentzug innerhalb von 24 Stunden einen Entwicklungszyklus, der mit der Ausbildung von zwei verschiedenen Zelltypen - Stiel- und Sporenzellen - endet (Übersicht: Loomis, 1975).

Bei *D. discoideum* tritt bei einem kurzfristigen Entzug von Aminosäuren eine selektive Unterbeladung der Q-defizienten tRNA^{Asn} auf. Eine solche deacylierte tRNA könnte einen Zerfall von Polysomen auslösen (vgl. Modell von Bergmann und Lodish, 1979) und somit ein erstes Signal für die zu Beginn des Entwicklungszyklus ablaufenden Prozesse sein (Dingermann et al., 1981).

Veränderungen des Aminoacylierungsgrades einer tRNA könnten hiernach auch in Eukaryonten regulatorische Funktion bei der Genexpression haben (in *E. coli* wird die Expression des *trp*-Operons über den Beladungszustand der tRNA^{Trp} reguliert (Morse und Morse, 1976)).

Ähnliches sollte auch für Veränderungen der Spiegel spezieller tRNAs gelten: Bisher gibt es nur indirekte Hinweise, daß die Menge einer spezifischen tRNA über ihre Syntheserate eingestellt wird (*Bombyx mori*: Fournier et al., 1976); in zwei Fällen konnte jedoch gezeigt werden, daß die zellulären Spiegel einer tRNA über ihren Abbau gesteuert werden (FL-Zellen: Litt und Howell-Litt, 1980; Vogelleber: Kanerva und Maenpaae, 1981).

Der Metabolismus von tRNA könnte durch modifizierte Nucleoside beeinflußt werden. In Tumorgewebe z.B., in denen der tRNA-Abbau gesteigert ist, werden auch Veränderungen im Ausmaß von tRNA-Modifikationen beobachtet. Besonders betroffen von diesen Veränderungen ist die Modifikation Queuosin.

Die vorliegende Arbeit wurde in zwei Teile gegliedert:

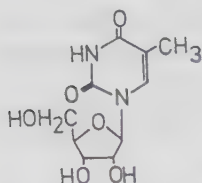
Gegenstand des ersten Teils (Teil A) war die Funktion von Ribosylthymidin (T) in Eubakterien, insbesondere der Einfluß dieser Modifikation auf die Genauigkeit der Proteinsynthese in intakten Zellen von *E. coli*.

Im zweiten Teil (Teil B) wurde *Dictyostelium discoideum* als Modellsystem zur Untersuchung der funktionellen Rolle von Queuosin (Q) eingeführt, und der Einfluß von Q auf den tRNA-Metabolismus des Schleimpilzes untersucht.

Teil A: Ribosylthymine in Eubakterien

A.0. EINLEITUNG

Ribosylthymine



Ribosylthymine (T) an Position 54 ist eine Modifikation, die in allen tRNAs von Eubakterien und in der Hauptklasse der eukaryontischen ElongationstRNAs in der konstanten Sequenz T₅₄CG enthalten ist. Es wird angenommen, daß dieser Bereich der tRNAs bei der Bindung an das Ribosom beteiligt ist (Erdmann et al., 1980).

In Eukaryonten hat die komplementäre Sequenz in der DNA bei tRNA-Genen die Funktion eines internen Promotors (Sharp et al., 1981).

Stämme von *E. coli*, denen das T-bildende Enzym, die m⁵U-Methylase, fehlt (trmA⁻), sind gegenüber Wildtypstämmen selektiv benachteiligt: Sie werden in Mischkulturen von den T-haltigen Stämmen überwachsen (Björk und Neidhardt, 1975) und besitzen auf Minimalagarplatten eine geringere Überlebensfähigkeit als diese (Albani, 1979).

Biochemische Untersuchungen, die dieses Verhalten erklären könnten, wurden bisher in intakten Zellen nicht gefunden.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß ein Fehlen der Methylierung zu Ribosylthymine die Stabilität der tRNA-Konformation erniedrigt (Albani, 1979, Davanloo et al., 1979). Bei der Bindung einer tRNA ans programmierte Ribosom sind die Wechselwirkungen mit der A-Seite schwächer, wenn die tRNA an Position 54 Uridin trägt (Kersten et al., 1981).

In in-vitro-Translationssystemen beeinflußt die Anwesenheit von Uridin statt Ribosylthymine in den tRNAs sowohl die Geschwindigkeit, als auch die Genauigkeit der Proteinsynthese:

Die Rate der poly(A)-codierten Polylysinsynthese ist erhöht, die Rate der poly(U)-codierten Polyphenylalaninsynthese erniedrigt, wenn die Methylierung an Position 54 von tRNA^{Lys} bzw. tRNA^{Phe} fehlt (Kersten et al., 1981, Praisler et al., 1981).

Bei der in-vitro-Synthese von Polyphenylalanin wird ein höherer Fehleinbau von Leucin gemessen, wenn statt der T-haltigen Gesamt-tRNA, tRNA mit U₅₄ eingesetzt wird. Hierbei hat das Fehlen der Methylierung sowohl in der tRNA^{Phe}, als auch in der für die Fehlinkorporation verantwortlichen tRNA₄^{Leu} einen negativen Einfluß auf

die Genauigkeit der Proteinsynthese (Praisler, 1984).

In intakten Zellen zeigten sich bei der Induktion der β -Galactosidase (ein grobes Maß für die Geschwindigkeit der Elongation) keine Unterschiede zwischen Stämmen mit T-haltigen und U-haltigen tRNAs. Die Genauigkeit der Termination der Proteinsynthese ist ebenfalls nicht in größerem Umfang verändert, wie aus dem Suppressionsmuster, das Nonsense-Mutanten von T-Phagen auf diesen Stämmen zeigen, geschlossen wird (Björk und Neidhardt, 1975).

Einen Hinweis auf eine regulatorische Funktion von Ribosylthymine in *E. coli* könnte die Beobachtung von Sprinzl et al. (1976) geben, daß die ribosomale Synthese von Guanosintetraphosphat (ppGpp) in vitro durch das Tetranucleotid T ψ CG, nicht aber durch UUCG ausgelöst werden kann: ppGpp ist das Mediatormolekül einer als "Stringent Response" bezeichneten Regulation, die bei Aminosäuremangel spezifisch die Genexpression auf der Transkriptions- und der Translationslitionsebene den Mangelbedingungen anpaßt. Die Synthese des modifizierenden Enzyms selbst, der m⁵U-Methylase, ist über diesen Mechanismus streng an die Synthese von stabiler RNA gekoppelt (Ny et al., 1980).

Neue Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen eine interessante Regulatormöglichkeit auf der Ebene der Initiation der Proteinsynthese auf: Die Initiation bei der MS2-Translation in vitro ist mit unformylierter Initiations-tRNA (d.h. bei Tetrahydrofolatmangel) nur möglich, wenn gleichzeitig die Methylierung an Position 54 fehlt (Männlein, 1983). In einem aminosäureauxotrophen Stamm von *E. coli*, dessen Elongations-tRNAs im Hinblick auf T voll modifiziert sind, wurde eine zusätzliche Initiations-tRNA (tRNA₂^{fMet}) gefunden, die an Position 54 ein unmodifiziertes Uridin trägt (und an Position 8 U statt s⁴U) (Praisler, 1984). Diese tRNA₂^{fMet} könnte die Initiation an bestimmten polycistronischen mRNAs bei Tetrahydrofolatmangel ermöglichen (Kersten et al., 1983).

Da diskutiert wird, daß der selektive Vorteil der *E. coli*-Stämme mit T an Position 54 der tRNAs auf einer höheren Stabilität einzelner Enzymsysteme während der stationären Phase beruhen könnte (Björk und Neidhardt, 1975; Albani, 1979), wurden in der vorliegenden Arbeit die Proteinmuster von trmA⁺- und trmA⁻-Stämmen während dieser Phase verglichen.

Der Einfluß von Ribosylthymine auf die Genauigkeit der Proteinsynthese in *E. coli* wurde mit Hilfe eines auf der Basis eines Modells von O'Farrell (1978) entwickelten Verfahrens untersucht: In trmA^+ - und trmA^- -Stämmen (his^- , rel^-) wurden die bei definiertem Histidinmangel erhöhten Fehler beim Lesen von His-Codons durch tRNA^{Gln} verglichen.

Die Genexpression bei Aminosäuremangel wurde in streng kontrollierten Stämmen von *E. coli* und *B. subtilis* untersucht: In Stämmen mit U bzw. T an Position 54 ihrer tRNAs wurde die Syntheserate von Gesamt-RNA und von einzelnen Proteinen verglichen.

Zur Diskussion der in den bisherigen Arbeiten über den Einfluß von Ribosylthymine auf die Genauigkeit und die Geschwindigkeit der Elongation der Proteinsynthese gefundenen Ergebnisse wurde ein Modell errechnet. Grundlage dieses Modells sind die in unserem Arbeitskreis gefundenen Veränderungen der Konformationsstabilität einer tRNA und der Bindung der tRNA in die A-Seite des Ribosoms.

A.1. MATERIAL UND METHODEN

A.1.1. Material und Geräte

In Tabelle A.1.1 sind die Bezugsquellen der wichtigsten Chemikalien und Hilfsmittel aufgeführt. Nicht erfaßt sind in dieser Aufstellung gängige Substanzen, wie Medienbestandteile, die im Reinheitsgrad "zur Analyse" oder "für biochemische Zwecke" von E. Merck, Darmstadt bezogen wurden. Die in diesem Teil der Arbeit verwendeten radioaktiven Verbindungen stammten alle vom Radiochemical Centre, Amersham (GB); die eingesetzten spezifischen Aktivitäten werden bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

Die Zusammensetzungen der Szintillatorlösungen zur Messung von Radioaktivitäten durch Flüssigszintillationszählung sind in Tabelle A.1.2 zusammengestellt.

Tabelle A.1.3 enthält eine Auswahl der benutzten Arbeitsgeräte.

Tab. A.1.1: Bezugsquellen wichtiger Chemikalien und Hilfsmittel

Bakterienzüchtungen

Hoffmann-La Roche AG, Grenzach
Boehringer, Mannheim

Trimethoprim (Geschenk)
Nucleoside

Radioaktivitätsmessungen

Zinser KG, Frankfurt

2,5-Diphenyloxazol (PPO)
1,4-Di-(2-(4-methyl-5-phenyl-
oxazolyl)-benzol (Dimethyl-POPOP)

Schleicher und Schüll, Dassel
C. Roth KG, Karlsruhe

Papierfilter, $\varnothing$ 23mm
Triton X 100, ungeklärt
(Charge vorgetestet)

Roentgenfilme

Kodak, USA	NS-2T (Autoradiographie)
	XOmat-AR, XAR-5 (Fluorographie)

Gelelektrophorese

C. Roth KG, Karlsruhe	Acrylamid, 4 x krist.
	Nonidet P-40
	Ammoniumperoxidisulfat
Serva Feinbiochemica, Heidelberg	N,N'-Methylenbisacrylamid, reinst
	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-
	diamin (TMED)
LKB, Schweden	Ampholine ^R pH 5-7 und pH 3,5-10
Bio-Rad Labs., Richmond, Calif., USA	Natriumdodecylsulfat (SDS)
	Harnstoff "ultra pure"
	Bio-Rad Protein Assay Kit
Boehringer, Mannheim	Ribonuclease A aus Rinderpankreas
Worthington, Freehold, USA	Desoxyribonuclease II

Tab. A.1.2: Zusammensetzung der verwendeten Szintillatorlösungen

Gefällte, nicht wäßrige Proben

Toluolszintillator

PPO 5 g, Dimethyl-POPOP 0,3 g, Toluol ad 1 l

Gelöste, wäßrige Proben

Dioxanszintillator

PPO 4 g, Dimethyl-POPOP 0,2 g, Naphthalin 60 g,
Ethylenglycol 20 ml, Methanol 100 ml, Dioxan ad 1 l

Toluol-Triton-Szintillator

PPO 3,5 g, Dimethyl-POPOP 0,21 g, Triton X 100 300 ml,
Toluol ad 1 l

Tab. A.1.3: Liste verwendeter Arbeitsgeräte

Bakterienzüchtungen

Infors AG, Basel ,Schweiz	Schüttelwasserbad HT
LKB, Schweden	Perpex-Pumpe 10 200 (zur definier- ten Histidineinleitung ins Medium)
Zeiss, Oberkochen	Spektral-Photometer PMQ III
Eppendorf, Hamburg	Spektrallinien-Photometer 1101 M

Zentrifugen

Sarstedt, Nümbrecht	Tischzentrifuge
DuPont de Nemours GmbH, Bad Nauheim	Sorvall SS-3 Automatic

Aufschluß von Zellen

Braun, Melsungen	Mikrodismembrator II (B. subtilis)
Branson Sonic Power Corp., USA	Sonifier B-12 (E. coli)

Lyophilisation

UniEquip, München	Speed Vac Concentrator
-------------------	------------------------

Radioaktivitätsmessungen

Packard, USA	Tricarb-Flüssigkeitsszintillations- zähler Modell 3385 und 2660
--------------	--

Gelelektrophorese

Isco, Lincoln, USA	Netzgerät Modell 493
Werkstatt des Instituts	Elektrophoreseapparaturen (vgl. Schachner, 1981)

A.1.2. Bakterienstämme und Wachstumsbedingungen

Die verwendeten Stämme von *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* wurden in Erlenmeyerkolben auf Schüttelbrettern bei 37°C und 100 Upm gezüchtet. Um eine ausreichende Belüftung zu gewährleisten, waren die Kolben nur zu 20% des Nennvolumens mit Medium gefüllt. Für die eigentlichen Untersuchungen wurden Übernachtskulturen 1:100 mit frischem Medium verdünnt.

Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte der Kulturen bei 578 nm (Zeiss PMQ III oder Eppendorf 1101M) verfolgt.

Alle unten aufgeführten Stämme von *E. coli* waren Geschenke von Dr. Björk (Umea, Schweden); *B. subtilis* BR19 wurde uns von Dr. Fortnagel (Hamburg) zur Verfügung gestellt.

A.1.2.1. *Escherichia coli*

E. coli CP79 (arg^- , his^- , leu^- , thr^- , thi^- , rel^- , trm^+ (= T54)) und der davon durch chemische Mutagenese mit Ethylmethansulfonat abgeleitete Stamm IB5 (trm^- (= U54)) wurden in folgendem Medium gezüchtet:

I	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 g	
	Zitronensäure	2,0 g	
	NaNH ₄ HPO ₄ x 4H ₂ O	3,5 g	
	K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	12,6 g	
	Aqua bidest	ad 875 ml	(pH 7,0)
II	Glucose	2,0 g	
	Aqua bidest	ad 50 ml	
III	Arg, His, Leu, Thr, Ile, Val	je 0,1 g	
	Aqua bidest	ad 50 ml	
IV	Thiamin	1 mg	
	Aqua bidest	ad 25 ml	

Die Lösungen wurden autoklaviert (I,II - 30min, 121°C) bzw. sterilfiltriert (III,IV) und unmittelbar vor Gebrauch vereinigt.

Der Zusatz von Isoleucin und Valin war für das optimale Wachstum beider Stämme nötig (s. A.2.1. und Albani, 1979).

E. coli GB1-5-41 (argH^- , trmA^+ (= T54)) und GB1-5-753 (thiA^- , trmA^- (= U54)), sowie die davon abgeleiteten relA-Stämme GB1-5-41 relA und GB1-5-753 relA sind Mutantenpaare, die nicht durch chemische Mutagenese, sondern durch Phagentransduktion erhalten wurden (Björk und Neidhardt, 1975).

Das Kulturmedium für diese Stämme war wie folgt zusammengesetzt (Fraenkel und Neidhardt, 1961):

I	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 g	
	CaCl ₂	0,011 g	
	KH ₂ PO ₄	13,6 g	
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	8,9 g	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g	
.	Aqua bidest.	ad 900 ml	(pH 6,5 mit NaOH)
II	Glucose	2,0 g	
	Aqua bidest.	ad 50 ml	
III	Arginin	0,1 g	
	Aqua bidest.	ad 25 ml	
IV	Thiamin	1 mg	
	Aqua bidest.	ad 25 ml	

Die Sterilisation und Fertigstellung des Mediums erfolgte wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben.

A.1.2.2. *Bacillus subtilis*

B. subtilis W23 aus der Sammlung des Instituts wurde in einem Glucose-Salz-Medium nach Nakada (1965) gezüchtet (Schmidt, 1977 : Medium "B"). Für den Stamm BR19 (*hisA*⁻, *tryC2*⁻, *spo*⁺) wurden diesem Medium noch Tryptophan und Histidin (je 100 mg/l) als steril-filtrierte Lösungen zugesetzt.

Wenn die Methylierung der tRNAs an Position 54 durch Zugabe von Trimethoprim (10-50 mg/l) gehemmt werden sollte, wurden zum Wachstum noch folgende folatabhängige Metaboliten benötigt (Schmidt, 1977):

Adenosin, Guanosin, Desoxythymidin	je 100 mg/l
Glycin, Methionin	je 20 mg/l

Diese Substanzen können in der angegebenen Menge in 50 ml glucose-freiem Nakada-Medium durch kurzes Erhitzen auf 60°C gelöst werden. Die entstehende, übersättigte Lösung (Purinnucleoside!) ist steril-filtrierbar.

A.1.3. Aminosäuremangelbedingungen

A.1.3.1. Histidinmangel

Um die Genauigkeit der Proteinbiosynthese in histidinauxotrophen $relA^-$ -Stämmen von *E. coli* zu vergleichen, war es erforderlich, einen exakt definierten, zeitlich konstanten Histidinmangel zu erzeugen.

Alle im folgenden beschriebenen Arbeiten wurden bei 37°C ausgeführt.

Aus exponentiell wachsenden Kulturen von *E. coli* CP79 ($trmA^+$) oder IB5 ($trmA^-$) wurden bei einer optischen Dichte (A_{578}) von 0,25 ($= 1 \times 10^8$ Zellen/ml) 9 ml entnommen. Die Bakterien wurden durch 2 Minuten Zentrifugation in der Tischzentrifuge geerntet, einmal mit histidin-freiem Medium gewaschen und schließlich in diesem Medium wieder zum Ausgangsvolumen resuspendiert. Danach wurde die Bakteriensuspension in ein 50ml-Zentrifugenglas überführt und bei 37°C und 300Upm in einem Schüttelwasserbad HT bewegt. Zwischen der Ernte und dem Resuspendieren lagen maximal 5 Minuten.

Zu den Kontrollzellen wurden sofort 100 µg/ml Histidin gegeben.

Bei den Mangelkulturen wurde mit der kontinuierlichen Einleitung von Histidin begonnen: 1,25 - 10 nmol/ml Histidin pro Stunde wurden durch eine Kanüle, die bis auf den Boden des Kulturgefäßes reichte, zugeführt. Die hierzu verwendete peristaltische Pumpe LKB 10 200 war mit einer Getriebeübersetzung von 1:1000 und einem Schlauchdurchmesser von 1,1 mm ausgestattet. Das Lösungsvolumen, das pro Stunde bei dieser Anordnung den 9ml-Kulturen zugeführt wurde, lag bei nur 0,7 ml.

A.1.3.2. Isoleucinmangel

Ein Isoleucinmangel kann in von *E. coli* K12 abgeleiteten Stämmen durch eine Blockade des *ilv*-Operons ausgelöst werden (zusgef. in Umbarger, 1969).

Exponentiell im isoleucin- und valinfreien Medium wachsende Kulturen ($A_{578} = 0,25$) werden hierzu mit 400 µg/ml Valin versetzt (O'Farrell, 1978). Der Aminosäuremangel kann durch Zugabe von 40 µg/ml Iso-leucin wieder aufgehoben werden.

A.1.3.3. Methioninmangel

Da die bakterielle Synthese von Methionin N^5 -Methyl-Tetrahydrofolat als C1-Gruppendonator benötigt, kann in *B. subtilis* ein Mangel dieser Aminosäure durch Hemmstoffe der Dihydrofolatreduktase induziert werden:

Zellen aus der logarithmischen Phase ($A_{578} = 0,4$) werden nach dem Abzentrifugieren und Waschen (s. A.1.3.1.) in einem Medium suspendiert, das 10 - 50 µg/ml Trimethoprim, sowie sämtliche folatabhängigen Metaboliten, außer Methionin enthält (A.1.2.2.: Adenosin, Guanosin, Desoxythymidin, Glycin).

A.1.4. Radioaktive Markierung von Zellkomponenten

A.1.4.1. Bestimmung der Syntheseraten von Protein und RNA

Als Maß für die Proteinsynthese in *E. coli* und *B. subtilis* diene der Einbau von ^{14}C -Phenylalanin (0,25 µCi/ml, 12,5 - 50 mCi/mmol) in mit Trichloressigsäure (TCA) fällbares Material:

Die Markierungskulturen wurden bei 37°C durch Schütteln belüftet - 1ml-Kulturen in Fraktionsgläsern (Ø 16mm) bei 1000 Upm auf einem IKA-Vibrax-Schüttler, 9ml-Kulturen wie in A.1.3.1. beschrieben. Zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten wurden aus den Kulturen 50 µl entnommen und auf Papierfilter pipettiert. Zur Fällung wurden die Filterplättchen dann 30 Minuten in eiskalte 10%ige TCA gelegt. Nach jeweils dreimaligem Waschen mit 5%iger TCA, Ethanol und Ether wurden die Filterplättchen getrocknet und die Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung in 4 ml Toluolszintillator bestimmt.

Wenn gleichzeitig mit der Proteinsynthese auch die RNA-Synthese gemessen werden sollte, wurde dem Medium neben ^{14}C -Phenylalanin (0,25 $\mu\text{Ci/ml}$, 2 mCi/mmol) noch ^3H -Uridin (5 $\mu\text{Ci/ml}$, 62,5 mCi/mmol) als radioaktive Vorstufe zugesetzt (Arnold und Ogilvie, 1977).

A.1.4.2. Markierung von Zellprotein zur Gelelektrophorese

Unter definierten Histidinmangelbedingungen (A.1.3.1., $A_{578} \approx 0,25$) wurden 9ml-Kulturen von *E. coli* mit 5 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S -Methionin (≤ 1270 Ci/mmol) versetzt. Nach 5 Minuten wurde der Einbau durch Zugabe von unmarkiertem Methionin (500 $\mu\text{g/ml}$) gestoppt und die Kulturen in Eis abgekühlt. Die Bakterien wurden durch 20 Minuten Zentrifugieren bei 10 000 g, 4°C geerntet und mit Aufschlußpuffer pH 7.4 (s. A.1.5.) gewaschen.

Bei *B. subtilis* wurde ^{35}S -Cystein (6 $\mu\text{Ci/ml}$, ≤ 640 Ci/mmol) zur Markierung verwendet, da das Medium unmarkiertes Methionin enthielt (vgl. A.1.2.2.). Die Aufarbeitung erfolgte analog.

A.1.5. 2-Dimensionale Gelelektrophorese von Proteinen

Aufschlußpuffer pH 7,4

Tris·HCl 10 mM, MgCl_2 5 mM; pH 7,4

Lyse-Puffer

Harnstoff 9,5 M, B-ME 5% (v/v), Ampholine pH 5-7 2%,

Ampholine pH 3,5-10 0,4%, Nonidet P-40 2%(w/v)

Portioniert bei -20°C gelagert

RNAase/DNAase-Lösung

RNAase A 1mg/ml, DNAase II 2mg/ml in Aufschlußpuffer pH 7,4

Bei -20°C lagern

A.1.5.1. Aufschluß der Zellen

Der für E. coli-Zellen verwendete Aufschluß ist eine Kombination von zwei von O'Farrell (1975) beschriebenen Methoden:

10^9 - 10^{10} Zellen wurden in 100 μ l Aufschlußpuffer pH 7,4 suspendiert und in einem Eppendorfcap mit dem Branson Sonifier (Mikrospitze, 20-30W) viermal 5 Sekunden lang beschallt. Nach Zugabe von 4 μ l RNAase/DNAase-Lösung wurden die Proben 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 100 mg pulverisierter Harnstoff und, bei 20°C, 180 μ l Lyse-Puffer zugesetzt. Ein zweimaliges Einfrieren und Auftauen diente zum Zerstören noch verbliebener Membranfragmente; die Lösung wurde dadurch fast klar. Die Proben wurden bei -70°C gelagert.

Da das für E. coli beschriebene Verfahren bei B. subtilis nur sehr schlechte Ausbeuten ergab, wurden für diese Zellen eine Reihe anderer Aufschlußmethoden ausgetestet (Alcoa, modifizierte Ultraschallaufschlüsse). Befriedigende Ergebnisse lieferte erst der Einsatz einer Vibratormühle:

Zellen aus 10 ml Kultur ($A_{578} = 0,5 - 2,0$) wurden in 250 μ l 1:5 verdünntem Aufschlußpuffer pH 7,4 suspendiert. Die im flüssigen Stickstoff eingefrorenen Proben wurden mit dem Mikrodismembrator II (Mikrokapsel 3 ml, Wolframcarbidkugel 8 g) 90 Sekunden lang gemahlen. Dabei wurde ein Auftauen der Proben durch Arbeiten bei 4°C im Kühlraum und durch Vorkühlen der Kapsel in flüssigem Stickstoff vermieden. Die Proben wurden im Speed Vac Concentrator lyophilisiert und anschließend in 100 μ l Lyse-Puffer durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen gelöst. Ein verbleibender unlöslicher Rückstand wurde durch Zentrifugation in der Tischzentrifuge entfernt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -70°C.

A.1.5.2. Analyse der Proben

Der Bio-Rad Protein Assay Kit^R erlaubt eine Proteinbestimmung auch in den zum Auftrag fertigen Proben, die Tris-HCl enthalten. Als Standard wird Rinder-Gamma-Globulin mitgeliefert:

2 µl Probenlösung werden direkt in einer Einmalküvette mit 1 ml Reagenz (1+4 mit Wasser verdünnt) versetzt. Die Extinktion bei 595 nm wird nach 10 Minuten gemessen.

Bei einer optischen Dichte der Bakterienkulturen (A_{578}) von 1,0, müssen von *E. coli* 25 ml ($= 10^{10}$ Zellen) und von *B. subtilis* 10 ml Kultur wie beschrieben aufgearbeitet werden, um die zum Auftragen günstige Proteinkonzentration von 20 µg/µl zu erhalten.

Zur Bestimmung der Radioaktivität in den Proben wurden vor dem Auftragen 2 µl der Lösung entnommen und in Dioxanszintillator gezählt.

Proben aus *E. coli*-Zellen, die wie in 1.4.2. angegeben (9ml Kultur, $A_{578} = 0,25$) mit ^{35}S -Methionin markiert wurden, enthielten etwa 7×10^4 cpm/µl. Bei der Markierung von *B. subtilis* mit ^{35}S -Cystein lag die Aktivität der Proben unter 1×10^4 cpm/µl.

A.1.5.3. Elektrophoretische Trennung der Proteine

Die zweidimensionale Trennung von Proteinen wurde mit geringfügigen Modifikationen (Neidhardt, 1979) nach der Methode von O'Farrell (1975) durchgeführt. Sehr ausführliche Arbeitsvorschriften, sowie alle benötigten Lösungen finden sich bei E. Schachner (1981) und bei F. Pistel (1982).

Das Trennprinzip der ersten Dimension ist eine isoelektrische Fokussierung; sie wurde bis zur Gleichgewichtseinstellung durchgeführt.

Die bei Pistel (1982) angegebene Zusammensetzung des hierzu verwendeten Gels erlaubt eine Fokussierung aller Proteine, deren isoelektrischer Punkt zwischen pH 3,5 und 10 liegt. Um den pH-Bereich von 5-7 über die gesamte Gelbreite zu spreizen, müssen 80% der Ampholine pH 3,5-10 durch Ampholine pH 5-7 ersetzt werden.

Bei den eingesetzten Ampholinchargen ließ sich die Trennschärfe des Gels verbessern, wenn deren Gesamtmenge um 50 bis 100% erhöht wurde - ein Effekt, der sich besonders deutlich bei Proben von *B. subtilis* bemerkbar machte.

Zur Fokussierung wurde die angelegte Spannung 15 Stunden konstant auf 400V gehalten und anschließend noch für 1 Stunde auf 1000V erhöht (7000 V·h).

In der zweiten Dimension werden die Proteine nach ihrer Größe in SDS-Gelen mit 11,5% Acrylamid aufgetrennt (Laemmli, 1970; Pistel, 1982).

Bis zu 250 µg Gesamtprotein aus *E. coli* können unter den beschriebenen Bedingungen auf ein Gel aufgetragen werden.

A.1.5.4. Detektion der aufgetrennten Proteine

Nicht radioaktiv markierte Proteine wurden durch Anfärben mit Coomassie Blue oder Serva Blau R sichtbar gemacht (vgl. Pistel, 1982). Dieses Verfahren erfordert mindestens 50 bis 100 µg Protein pro Gel und erlaubt die Detektion von etwa 300 Proteinen im Gesamtextrakt von *E. coli*, wenn 250 µg Protein aufgetragen werden.

Geringere Proteinmengen (10-20 µg/Gel) können durch die Silberfärbung nach Merril et al. (1979) erfaßt werden. Diese Methode, sowie die von mir durchgeführten Modifikationen der Originalvorschrift, die für die Anwendung bei 1,5 mm starken Gelen nötig sind, wurden bei E. Schachner (1981) beschrieben.

Mit ^{35}S markierte Proteine wurden durch Autoradiographie der Gele auf Kodak Roentgenfilm NS-2T detektiert: wenn 3×10^6 dpm aufgetragen werden, so sind nach 5 Tagen bereits mehr als 500 Flecken im Gesamtprotein von *E. coli* zu erkennen.

Die Empfindlichkeit der Detektion von mit ^{35}S markierten Proteinen kann auf etwa das Zehnfache gesteigert werden, wenn statt der Autoradiographie eine Fluorographie von mit PPO imprägnierten Gelen durchgeführt wird (Bonner und Laskey, 1974).

A.2. ERGEBNISSE

A.2.1. Wachstum der Bakterienstämme

Die funktionelle Rolle von Ribosylthymine in den tRNAs von *E. coli* wurde mit Hilfe von Stämmen untersucht, die eine Mutation im *trmA*-Gen tragen und somit ihre Fähigkeit, die m^5U -Methylase zu bilden, verloren haben. Die Stämme unterscheiden sich im wesentlichen durch die Art der Mutagenese, die zu diesem Defekt führte: *E. coli* IB5 wurde von Björk und Neidhardt (1971) nach Behandlung mit Ethylmethansulfonat isoliert; die Stämme GB1-5-753 $relA^+$ und $relA^-$ konstruierten die genannten Autoren (1975) durch Phagentransduktion.

Typische Wachstumskurven des Stammes *E. coli* CP79 ($trmA^+$ (=T54)) und der daraus abgeleiteten Mutante IB5 ($trmA^-$ (=U54)) sind in Abbildung A.2.1a gezeigt. Das etwas langsamere Wachstum des U-haltigen Stammes, das auch von M. Albani (1979) beobachtet wurde, ist nicht auf das Fehlen der Methylierung an Position 54 der tRNAs zurückzuführen, wie Björk und Neidhardt (1975) unter Verwendung von genetisch besser definierten Transduktantenpaaren nachgewiesen haben. Auch bei den uns zur Verfügung gestellten isogenen $relA^+$ - bzw. $relA^-$ -Paaren GB1-5-41 ($trmA^+$ (=T54)) und GB1-5-753 ($trmA^-$ (=U54)) war kein Unterschied im Wachstum meßbar (Abb. A.2.1b).

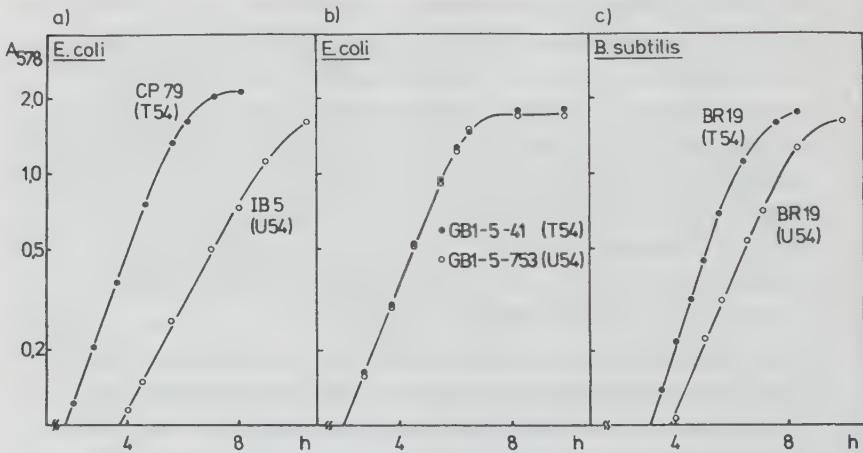
Der ausgeprägte wachstumsfördernde Effekt von Isoleucin und Valin, der von M. Albani (1979) zuerst bei *E. coli* IB5 gefunden wurde, dürfte ebenfalls kein Effekt der $trmA^-$ -Mutation sein: Zwei Jahre nach diesen Versuchen hatte auch der T-haltige Elternstamm CP79 lag-Phasen von mehr als 5 Stunden, wenn das Medium nur die vier für ihn essentiellen Aminosäuren enthielt (nicht gezeigt).

In *B. subtilis* läßt sich die Bildung von Ribosylthymine durch Trimethoprim, einen Hemmstoff der Dihydrofolatreduktase, blockieren (Arnold, Schmidt, Kersten, 1975). Die dabei gleichzeitig auftretende Wachstumshemmung kann durch Zugabe folatabhängiger Metaboliten (Purine, Desoxythymidin, Glycin, Methionin) weitgehend aufgehoben werden (Harvey, 1973). Werden der Hemmstoff und die Metaboliten

während der logarithmischen Phase zugesetzt ($A_{578} = 0,25$), so ändert sich die Wachstumsrate von *B. subtilis* W23 für die beiden folgenden Generationen praktisch nicht (Arnold und Ogilvie, 1977).

Da tRNAs, die vor der Zugabe von Trimethoprim gebildet wurden, Ribosylthymine enthalten, wurden der Hemmstoff und die Metaboliten im folgenden gleich beim Überimpfen zum Medium gegeben. Unter diesen Bedingungen verringert sich die Wachstumsrate im Vergleich zu Kontrollzellen, die nur in Gegenwart der folatabhängigen Metaboliten wachsen: bei *B. subtilis* W23 sinkt sie auf die Hälfte (nicht gezeigt), beim Stamm BR19 auf etwa 70% (Abb. A.2.1c).

Abb. A.2.1: Wachstum der verwendeten Bakterienstämme



Stämme mit T an Position 54 der tRNAs : -●- / mit U54 : -○-

(a) *E. coli* CP79 (-●-) und IB5 (-○-) :

Generationszeit 1:00 h und 1:15 h

(b) *E. coli* GB1-5-41 *relA* (-●-) und GB1-5-753 *relA* (-○-) :

Generationszeit 1:10 h - identisch :

E. coli GB1-5-41 *relA*⁺ und GB1-5-753 *relA*⁺

(c) *B. subtilis* BR19: Minimalmedium mit folatabhängigen Metaboliten
supplementiert, ohne (-●-) und mit (-○-) 10 µg/ml Trimethoprim

Generationszeit 0:50 h und 1:08 h

A.2.2 Proteinmuster von *E. coli* trmA^+ und trmA^- in der stationären Phase

Fehlt in *E. coli* das Enzym, das das Uridin an Position 54 der tRNAs zu Ribosylthymine methyliert, so ist der betroffene Stamm selektiv benachteiligt, wie ein mikrobiologisches Experiment von Björk und Neidhardt zeigt (1975): In Mischkulturen isogener Stämme von *E. coli*, die sich nur in dieser Modifikation unterscheiden, überwächst der Stamm mit T54 die U-haltige Mutante, wenn sie gemeinsam mehrere Male bis in die stationäre Phase hochgewachsen und wieder überimpft worden sind.

Die Autoren konnten die nähere Ursache für diesen Befund nicht klären; weder die Wachstumsrate der Stämme in Einzelkulturen, noch einer der während des logarithmischen Wachstums gemessenen Parameter - wie die RNA-Zusammensetzung, die Aktivität verschiedener Enzyme des Aminosäurestoffwechsels und die Induktion der β -Galaktosidase - wurden durch die Anwesenheit von Ribosylthymine verändert. Aufgrund dieser Befunde diskutierten sie, daß sich das Fehlen dieser Modifikation erst während des Selektionsdrucks der stationären Phase bemerkbar machen könnte.

In eine ähnliche Richtung deutet die Beobachtung von M. Albani (1979), daß der Stamm *E. coli* CP79 (T54) eine größere Überlebensfähigkeit bei der Lagerung auf Minimalagar besitzt als die davon abgeleitete Mutante IB5 (U54).

Ein solches Verhalten könnte durch eine verringerte Stabilität einzelner Enzymsysteme in Stämmen, denen die Modifikation T fehlt bedingt werden (Albani, 1979). Als Ursache wäre sowohl eine schnellere Degradation von (u.U. fehlerhaften) Proteinen, als auch deren verlangsamte Neubildung in Stämmen ohne Ribosylthymine während der stationären Phase denkbar.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Proteine aus stationären Kulturen von trmA^+ und trmA^- *E. coli* durch 2D-Gelelektrophorese nach O'Farrell aufgetrennt und die Muster verglichen. Da von Neidhardt et al. (1983) inzwischen über 160 Proteine aus *E. coli* in diesem System kartiert wurden, ist die Chance möglicherweise betroffene Proteine zu identifizieren relativ hoch.

A.2.2.1 Vergleich der Stämme *E. coli* CP79 (T54) und IB5 (U54)

Um den Einfluß von Ribosylthymine auf die Proteinzusammensetzung in der stationären Phase zu untersuchen, wurden aus Kulturen der Stämme *E. coli* CP79 (T54) und IB5 (U54) am Ende des logarithmischen Wachstums, sowie 12 und 24 Stunden später, Proben entnommen. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet und wie in A.1.5.1. beschrieben aufgeschlossen. Jeweils 200 µg Gesamtprotein wurden durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt (A.1.5.3.). Durch Coomassie-Färbung konnten etwa 200 Flecken sichtbar gemacht werden. Von einer Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit durch die Silberfärbung nach Merrill et al. (1979) wurde abgesehen, da eigene Erfahrungen gezeigt hatten, daß diese Methode besonders bei schwachen Flecken keine Quantifizierung erlaubt (mögliche Ursache: Schwankungen bei der Bildung der Silberkeime). Beim Vergleich der Gele der beiden Stämme waren Unterschiede nur für zwei Proteine festzustellen (Pfeile in Abb. A.2.2): Das eine Protein nahm mengenmäßig nach 12 Stunden stationärer Phase im Stamm IB5 (U54) ganz auffallend zu, während es in *E. coli* CP79 auch nach 24 Stunden noch fast nicht detektierbar war; das andere Protein lag im Stamm CP79 ab dem Ende des logarithmischen Wachstums in höherer Konzentration vor, als in der U-haltigen Mutante.

A.2.2.2 Vergleich des Transduktantenpaares GB1-5-41re1A (T54) und GB1-5-753re1A (U54)

Da *E. coli* IB5 (U54) aus dem Stamm CP79 (T54) durch chemische Mutagenese gewonnen wurde, besteht die Möglichkeit, daß sich die beiden Stämme nicht ausschließlich im *trmA*-Gen unterscheiden. Besser geeignet für physiologische Untersuchungen sind aus diesem Grund Transduktantenpaare, bei denen die Mutation gezielt durch die Phagentransduktion eines *trmA*⁻-Allels eingeführt wurde. Mit einem solchen uns von Dr. Björk zur Verfügung gestellten Paar von Stämmen wurde das obenstehende Experiment wiederholt. Abbildung A.2.3 zeigt die Gele 24 Stunden stationärer Kulturen.

Die in *E. coli* IB5 (U54) gefundene Akkumulation eines Proteins konnte

nicht beobachtet werden. Das im Stamm CP79 (T54) in erhöhter Konzentration vorliegende Protein ist beim Transduktantenpaar im U-haltigen Stamm in größerer Menge vorhanden als im T-haltigen. -

Beide Veränderungen dürften somit nicht ursächlich mit dem Fehlen von Ribosylthymine zusammenhängen.

In dieser Versuchsreihe wurden Ampholine einer neuen Charge in einer gegenüber der Originalvorschrift um 50% erhöhten Konzentration (A.1.5.3.) eingesetzt. Die gelelektrophoretische Trennung verbesserte sich dadurch so, daß es möglich war, den Vergleich der beiden Stämme auf über 300, d.h. auf über ein Viertel aller Proteine von *E. coli*, auszudehnen. Bei der visuellen Auswertung der Gele waren, außer dem oben beschriebenen, keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den Proteinmustern der Stämme mit T bzw. U an Position 54 ihrer tRNAs feststellbar.

Legende zu Abbildung A.2.2:

Bakterien aus 24 Stunden stationären Kulturen wurden wie in A.1.5. beschrieben aufgeschlossen, und das Gesamtprotein durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt (Coomassie-Färbung).

Von rechts nach links: Isoelektrische Fokussierung pH 5-7.

Von oben nach unten: Auftrennung nach Größe im 11,5% PAA-SDS-Gelel.

links: *E. coli* CP79 ($\text{trmA}^+=\text{T54}$) - rechts: *E. coli* IB5 ($\text{trmA}^-=\text{U54}$)

Der linke Pfeil zeigt auf das in *E. coli* IB5 nach 12 Stunden akkumulierende Protein, der rechte Pfeil auf das Protein, das im Stamm CP79 in höherer Konzentration als im Stamm IB5 vorliegt.

Legende zu Abbildung A.2.3:

Die Proteinmuster 24 Stunden stationärer Kulturen. Zur Gelelektrophorese vgl. Legende zu Abb. A.2.2.

links: *E. coli* GB1-5-41relA (T54) - rechts: *E. coli* GB1-5-753relA (U54)

Mit Ausnahme eines Proteins (Pfeil), das im U-haltigen Stamm in erhöhter Konzentration vorliegt, sind die Muster beider Stämme völlig identisch. Auch am Ende des logarithmischen Wachstums und nach 12 Stunden stationärer Phase waren keine weiteren Unterschiede feststellbar.

Abb. A.2.2: 2D-Gelelektrophorese: Proteinmuster 24 Stunden
stationärer Kulturen der Stämme CP79 (T54) und IB5 (U54)

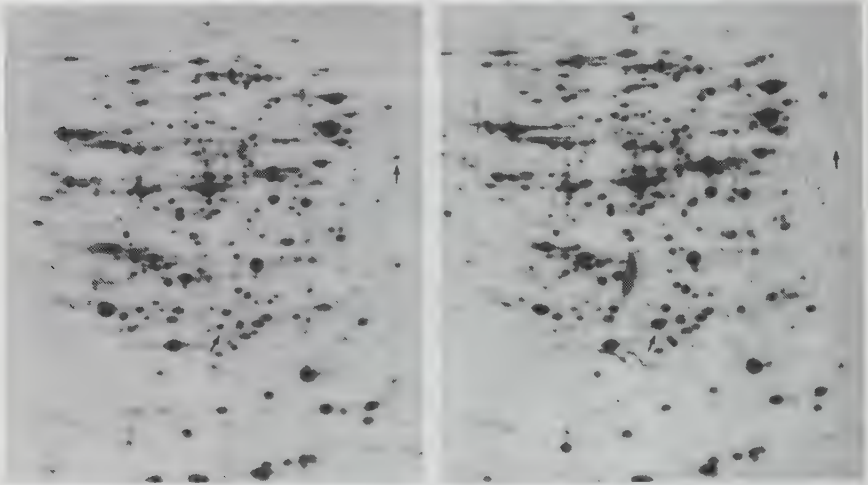
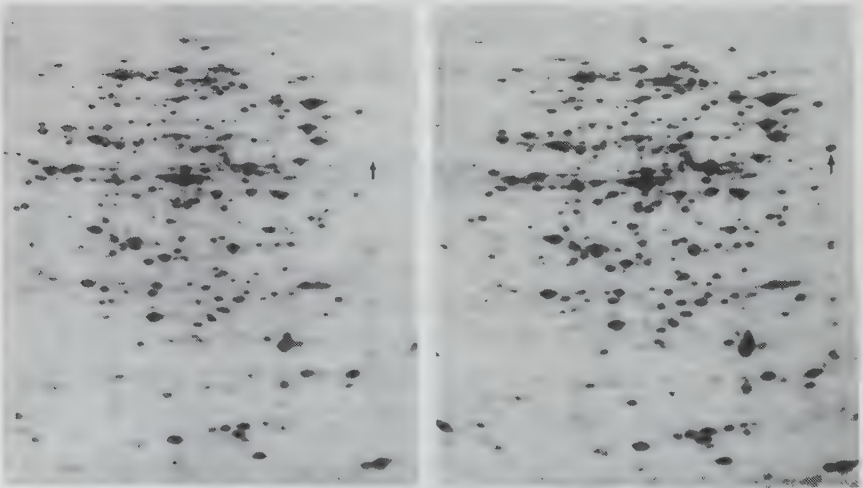


Abb. A.2.3: Proteinmuster des Transduktantenpaares GB1-5-41re1A (T54)
und GB1-5-753re1A (U54) nach 24 Stunden stationärer Phase



A.2.3. Einfluß von Ribosylthymine auf die Genauigkeit der Elongation der Proteinsynthese in intakten Zellen

Für viele komplexe biochemische Abläufe wurden sogenannte "in vitro"-Systeme entwickelt, mit deren Hilfe es möglich ist, die Abhängigkeit einzelner Teilschritte von den beteiligten Komponenten "im Reagensglas" zu untersuchen. Die Wahrscheinlichkeit, daß die hierbei gewonnenen Ergebnisse auch "in vivo" relevant sind, ist umso höher, je stärker die verwendeten Systeme den Bedingungen in der lebenden Zelle angenähert sind.

Ein Einfluß von Ribosylthymine auf die poly(U)-codierte Homopeptidsynthese, ließ sich für *E. coli* erst mit Hilfe eines von Jelenc und Kurland (1979) optimierten Systems nachweisen, dessen niedrige Magnesiumkonzentrationen den intrazellulären Verhältnissen entsprechen: Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß die Methylierung des Uridins an Position 54 von *E. coli* tRNAs zu Ribosylthymine sowohl die Rate, als auch die Genauigkeit der poly(U)-abhängigen poly(Phe)-Synthese erhöht (Praisler et al., 1981; Kersten et al., 1981).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob auch in intakten *E. coli*-Zellen erhöhte Fehler bei der Proteinbiosynthese nachweisbar sind, wenn die Modifikation T54 in den tRNAs fehlt.

Die Genauigkeit der Termination in trmA^+ - und trmA^- -Stämmen von *E. coli* wurde von Björk und Neidhardt (1975) mit Hilfe von Nonsense-Mutanten von T-Phagen überprüft. Sie fanden keinen Unterschied zwischen den Stämmen.

Zur Bestimmung von Elongationsfehlern in intakten Zellen (wie sie im poly(U)-System in vitro gemessen werden) stehen nur wenige Verfahren zur Verfügung: Der von Loftfield (1963) bestimmte Fehleinbau von Valin statt Isoleucin in ein Peptid des Ovalbumins bzw. des Hämoglobins (Loftfield und Vanderjagt, 1972) ist nach Edelmann und Gallant (1977) hauptsächlich auf eine Fehlbeladung der entsprechenden tRNAs zurückzuführen. Bei dem von den letztgenannten Autoren untersuchten Fehleinbau von Cystein in das Geißelprotein von *E. coli*, ist die erforderliche Reindarstellung des Proteins kritisch. Ähnliches dürfte für die kürzlich von Kurland (Bouadloun et al., 1983) beschriebenen

Messungen an den ribosomalen Proteinen L7/L12 und S6 von *E. coli* gelten.

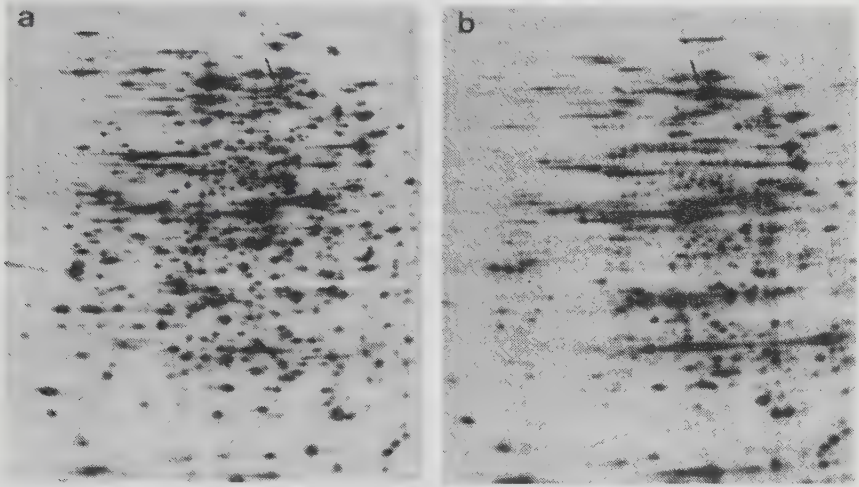
A.2.3.1. Nachweis von Fehlern bei der Proteinsynthese unter Histidinmangel in den rel^- -Stämmen *E. coli* CP79 und IB5

Für die vorliegende Fragestellung, ob die Genauigkeit der Proteinbiosynthese in einem Stamm mit U an Position 54 der tRNAs (IB5), gegenüber dem Elternstamm mit T54 (CP79) erniedrigt ist, ist es nicht erforderlich, die Fehlerraten in den beiden Stämmen absolut zu ermitteln.

Die im folgenden beschriebenen Versuche basieren auf einer Beobachtung von O'Farrell (1978) und Parker et al. (1978): In histidinauxotrophen Stämmen von *E. coli*, bei denen die strenge Kontrolle der RNA- und Proteinsynthese fehlt (vgl. A.2.4.), führt ein Histidinmangel zu einer stark erhöhten Fehlinkorporation von Glutamin in die neusynthetisierten Proteine; die His-Codons CAU und CAC werden falsch gelesen als CAG und/oder CAA. Da Glutamin keine basische Aminosäure ist, verschiebt sich der isoelektrische Punkt eines Proteins mit jedem Fehleinbau etwas zum sauren pH-Bereich hin. Die sich dadurch ergebende Inhomogenität der einzelnen Proteine ist sehr gut auf 2D-O'Farrell-Gelen zu beobachten: die betroffenen Proteine spalten sich bei der isoelektrischen Fokussierung in mehrere, etwa gleich weit voneinander entfernte Flecken auf. Von Parker et al. wurde das Phänomen mit dem Begriff "Stuttering" beschrieben.

Die von uns untersuchten Stämme *E. coli* CP79 ($trmA^+$ (=T54), rel^- , his^-) und IB5 ($trmA^-$ (=U54), rel^- , his^-) zeigen bei einem völligen Histidinmangel beide sehr ausgeprägtes "Stuttering". Wie aus den in Abbildung A.2.5 gezeigten Gelen von *E. coli* IB5 ersichtlich ist, könnten unter diesen Bedingungen eventuelle Unterschiede im Ausmaß von Fehlern nicht erkannt werden.

Abb. A.2.4: Autoradiogramme von 2D-Gelen: Mit ^{35}S -Methionin markierte Proteine von *E. coli* IB5 (*trmA*⁻, *relA*⁻, *his*⁻)



- a) Proteinmuster der Kontrollkultur: Bei einer Dichte von 1×10^8 Zellen/ml wurden die Bakterien abzentrifugiert, gewaschen, im histidinfreien Medium resuspendiert und mit $100\mu\text{g/ml}$ Histidin versetzt (vgl. A.1.3.1.). Nach 35 Minuten wurden die Zellen 5 Minuten mit ^{35}S -Methionin markiert.
- b) Proteinmuster der Parallelkultur: Die Bakterien wurden wie bei der Kontrollkultur beschrieben behandelt - es wurde jedoch kein Histidin zugesetzt.

Von rechts nach links: Isoelektrische Fokussierung pH 5-7.

Der Pfeil zeigt auf den Elongationsfaktor G (Neidhardt et al., 1983).

A.2.3.2. Theorie der unter Aminosäuremangel erhöhten Elongationsfehler in *E. coli* rel⁻

Wie im vorigen Abschnitt ausgeführt, ist bei Aminosäuremangel die Genauigkeit der Elongation der Proteinsynthese in rel⁻-Stämmen von *E. coli* erniedrigt. O'Farrell (1978) erklärt dies durch eine einfache Substratlimitation bei der Translation:

An Codons, die zu der limitierenden Aminosäure gehören, verzögert sich die Proteinsynthese dadurch, daß länger (T_{-aa}) als normal (T_n) nach einer passenden beladenen tRNA gesucht werden muß. Je länger diese "Suchzeit" T_{-aa} ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, daß eine falsche, zu einem verwandten Codon gehörige Aminosäure, eingebaut wird (Fehlerrate E_{-aa}). Aus dieser Überlegung läßt sich ableiten, daß die Erhöhung der Fehlerraten bei Aminosäuremangel proportional zur Verlängerung der "Suchzeit" sein sollte:

$$\frac{E_{-aa}}{E_n} = \frac{T_{-aa}}{T_n} \quad \text{bzw.} \quad E_{-aa} = E_n \cdot \frac{T_{-aa}}{T_n}$$

E_n : Grundfehler der Zelle ohne Aminosäuremangel;

T_n : "Suchzeit" nach der passenden Aminoacyl-tRNA unter diesen Bedingungen;

E_{-aa} / T_{-aa} : entsprechende Werte bei Aminosäuremangel

Zu einer Gleichung, die der oben angegebenen (Praisler et al., 1981) entspricht, kamen auch Harley et al. (1981).

Nach dieser Formel verhalten sich die Grundfehler E_n zweier Stämme genauso, wie ihre unter Aminosäuremangel erhöhten Fehler E_{-aa} , wenn die Suchzeit T_{-aa} in beiden Stämmen gleich groß ist. Diese Suchzeit T_{-aa} ist nicht direkt meßbar, sie hängt vom Beladungszustand der zugehörigen tRNA und somit von der intrazellulären Verfügbarkeit der limitierenden Aminosäure ab. Gut bestimmbar ist jedoch die Gesamtrate der Proteinsynthese, die von der Suchzeit T_{-aa} unmittelbar beeinflusst wird (O'Farrell, 1978; Harley et al., 1981). Ist diese Meßgröße in zwei zu vergleichenden Stämmen bei einem definierten Aminosäuremangel gleich, so kann daraus indirekt geschlossen werden, daß auch die Suchzeit T_{-aa} in beiden Stämmen gleich groß ist.

Ein definierter Aminosäuremangel kann somit dazu verwendet werden, die schwer bestimmbar Grundfehler E_n zweier Stämme auf meßbare Werte E_{aa} anzuheben, ohne daß sich das Verhältnis der Fehler ändert.

A.2.3.3. Definierter Histidinmangel in *E. coli* rel^-

Ein definierter Histidinmangel kann in *E. coli* nicht mit den bei Eukaryonten angewandten Methoden erzeugt werden:

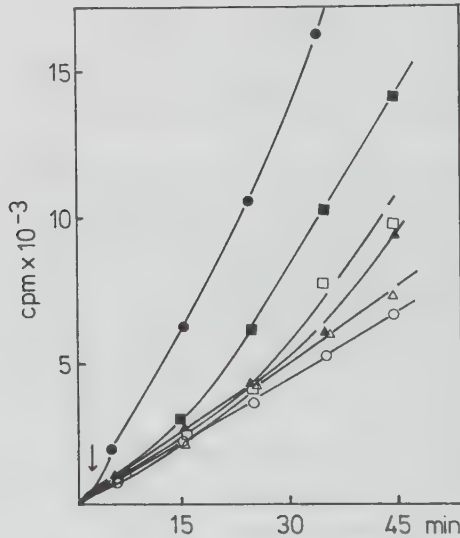
- (i) Bei einer Verringerung des Histidingehaltes im Medium wird lediglich die stationäre Phase früher erreicht, die Wachstumsrate bleibt jedoch unverändert.
- (ii) Histidinol, ein Hemmstoff der HistidinyI-tRNA-Synthetase (Hansen et al., 1972) ist in *E. coli* ein Zwischenprodukt der Histidinbiosynthese und wird deshalb in dieses umgewandelt.

In den nachstehend beschriebenen Experimenten wurden *E. coli*-Zellen wie folgt im definierten histidinlimitierten Wachstum gehalten (A.1.3.1.):

Zellen aus logarithmisch wachsenden Kulturen von *E. coli* CP79 (rel^- , his^- , $trmA^+$) oder IB5 (rel^- , his^- , $trmA^-$) wurden durch Zentrifugation geerntet, gewaschen und in histidinfreiem Medium resuspendiert. In diese Mangelkulturen wurden in der Zeiteinheit konstante Mengen an Histidin mittels einer peristaltischen Pumpe eingeleitet.

Wie Abbildung A.2.5 für *E. coli* IB5 zeigt, wird die Gesamtproteinbiosyntheserate durch die Menge des zur Verfügung stehenden Histidins bestimmt. Die im Elternstamm CP79 gemessenen Raten entsprechen bei definiertem Histidinmangel den in *E. coli* IB5 gefundenen.

Abb. A.2.5: Einbau von ^{14}C -Phenylalanin in *E. coli* IB5 (rel^- , his^- , trmA^-) unter variierenden Histidinmangelbedingungen



Bei einer Dichte von 1×10^8 Zellen/ml wurde *E. coli* IB5 geerntet, gewaschen und in histidinfreiem Medium resuspendiert (A.1.3.1). Als Maß für die Proteinsyntheserate diente der Einbau von ^{14}C -Phenylalanin ($0,25 \mu\text{Ci/ml}$, $12,5 - 50 \text{ Ci/mol}$): Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben von $50 \mu\text{l}$ entnommen und darin die mit TCA fällbare Radioaktivität bestimmt (A.1.4.1.).

Der Pfeil gibt den Zeitpunkt an, an dem der Kontrollkultur (●) $100 \mu\text{g/ml}$ Histidin zugesetzt wurden, bzw. an dem mit dem Einleiten von $1,25$ (◻), $2,5$ (◄), 5 (◻) oder 10 (○) nmol Histidin / ml Kultur in der Stunde begonnen wurde. Die offenen Kreise zeigen den totalen Histidinmangel.

Die cpm-Werte sind korrigiert auf eine spezifische Aktivität von 50 Ci/mol .

A.2.3.4. "Stuttering" in *E. coli* CP79 (T54) und IB5 (U54) bei definiertem Histidinmangel

Um die Genauigkeit der Proteinbiosynthese in den Stämmen *E. coli* CP79 und IB5 zu vergleichen, wurden deren Proteine unter den, im vorigen Abschnitt beschriebenen, Histidinmangelbedingungen mit ^{35}S -Methionin markiert und auf 2D-0'Farrell-Gelen aufgetrennt.

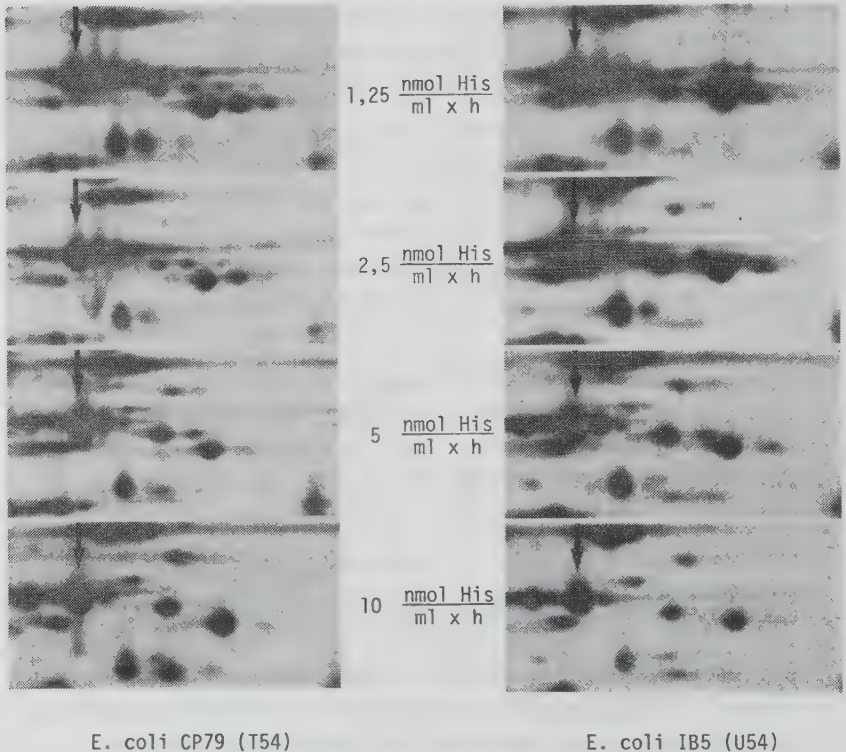
Abbildung A.2.6 zeigt Ausschnitte aus diesen Gelen, auf denen das "Stuttering" des Elongationsfaktors G zu sehen ist: Bei Histidinmangel finden sich rechts neben dem authentischen EF_G (Pfeil; Neidhardt et al., 1983) noch eine Reihe weiterer Proteine desselben Molekulargewichtes - hier wurden ein, zwei, drei u.s.w. Glutaminmoleküle an Stellen eingebaut, an denen korrekterweise Histidin sitzt.

Wird die eingeleitete Histidinmenge erhöht, so verringert sich die Anzahl der durchschnittlichen Glutamin/Histidin-Fehlinkorporationen in beiden Stämmen gleichermaßen: Die sichtbaren Flecken nehmen von 6 über 4-5 und 3 auf 2 ab, wenn man die zugeführte Histidinmenge von 1,25 über 2,5 und 5 auf 10 nmol/ml Kultur pro Stunde steigert.

Ein analoges Verhalten wurde für alle anderen untersuchten Proteine gefunden - das Ausmaß in dem bei gegebenem Histidinangebot "Stuttering" auftritt, war in jedem Fall in beiden Stämme identisch.

Der, unter den jeweiligen definierten Histidinmangelbedingungen zu messende, erhöhte Fehleinbau von Glutamin in die gebildeten Proteine ($E_{-\text{aa}}$ in A.2.3.2) wird somit durch eine Methylierung des U an Position 54 aller tRNAs nicht verringert. Nach den im vorletzten Kapitel dargestellten Überlegungen, ist hieraus zu schließen, daß sich auch der intrazelluläre Grundfehler E_n für das betrachtete Aminosäurepaar nicht verändert, wenn beide tRNAs, die um das Histidincodon konkurrieren, U an Position 54 tragen, statt T.

Abb. A.2.6: Definierter Histidinmangel in *E. coli* rel⁻:
2D-Gelelektrophorese der mit ³⁵S-Methionin markierten Proteine von *E. coli* CP79 (T54) und IB5 (U54) (Ausschnitte)



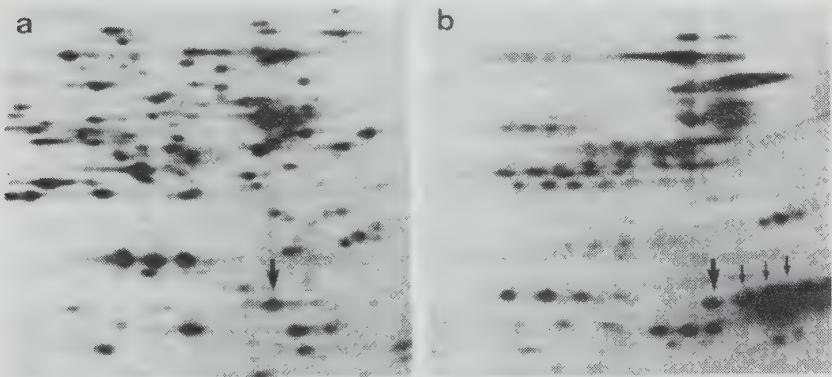
Die Zellen wurden wie bei Abb. A.2.4 beschrieben vorbehandelt und im histidinfreien Medium resuspendiert. In diese Mangelkulturen wurden 1,25, 2,5, 5 und 10 nmol His/ml Kultur pro Stunde eingeleitet. 35 min nach dem Beginn der Histidinzufuhr wurden die Zellen für 5 min mit ³⁵S-Methionin markiert (A.1.4.2.).

Der Pfeil zeigt auf den authentischen Elongationsfaktor G; rechts davon die Proteine, bei denen Histidin teilweise durch Glutamin ersetzt wurde (niedrigerer isoelektrischer Punkt).

Anhang: "Stuttering" in *B. subtilis* rel^+

"Stuttering" als Ausdruck einer extremen Erhöhung der Fehlerraten bei der Proteinsynthese im Aminosäuremangel wurde bisher nur bei *E. coli* und bei eukaryontischen Zellen untersucht. Bei *E. coli* zeigen in der Regel nur sogenannte "relaxed"-Mutanten (rel^-) dieses Phänomen (Parker und Friesen, 1980): In Wildtypstämmen (rel^+) wird die Proteinbiosynthese nicht direkt durch einen Mangel des Substrates Aminoacyl-tRNA gebremst, sondern durch eine übergeordnete Regulation mit ppGpp als Mediator (vgl. A.2.4.). Interessanterweise zeigt ein von uns untersuchter Stamm von *B. subtilis*, BR19, bei Histidinmangel starkes "Stuttering", obwohl er über den Mechanismus einer strengen Kontrolle verfügt (vgl. A.2.4.1.). Die Hemmung der Proteinsynthese durch ppGpp scheint somit in diesem evolutionär älteren Organismus, im Gegensatz zu *E. coli*, (noch?) nicht ausreichend zu sein, um bei Aminosäuremangel höhere Fehler zu vermeiden.

Abb. A.2.7: Histidinmangel in *B. subtilis*: Ausschnitte aus 2D-Gelen von mit ^{35}S -Cystein markierten Proteinen des Stammes BR19



Logarithmisch wachsende Zellen von *B. subtilis* BR19 (rel^+ , his^-) wurden wie bei Abb. A.2.4 beschrieben vorbehandelt und entsprechend mit ^{35}S -Cystein markiert (A.1.4.2., Fluorographie).

a) Kontrollkultur

b) Histidinmangel

A.2.4. Die Modifikation Ribosylthymidin und die strenge Kontrolle der Protein- und RNA-Synthese in Eubakterien

Wildtypstämme von *E. coli*, die nicht in den "rel"-Genen mutiert sind, verfügen über ein Regulationssystem, das die Biosynthese von rRNA und tRNA streng und die Proteinsynthese koppelt ("Stringent Response"): Bei Aminosäuremangel auftretende unterbeladene tRNAs induzieren die ribosomale Bildung von Guanosinpentaphosphat (pppGpp), aus dem dann Guanosintetraphosphat (ppGpp) entsteht. Letzteres reagiert als Mediatormolekül mit der RNA-Polymerase (Travers, 1976) und verändert deren Promotorspezifität: Es wird weniger rRNA und mRNA für die ribosomalen Proteine, jedoch mehr mRNA für die meisten anderen Proteine gebildet. Gleichzeitig wird ein Teil der Translationsfaktoren durch Komplexbildung blockiert (EF_{Tu} , EF_G , IF_2 : Pingoud und Block, 1981; Pingoud, persönl. Mittlg.).

Etwa ein Viertel aller Proteine in *E. coli* wird bei Anwesenheit von ppGpp vermehrt gebildet; die Synthese eines etwa gleichgroßen Anteils - dazu gehören die Elongationsfaktoren Tu, Ts und G und die Ornithin-decarboxylase - wird reduziert (O'Farrell, 1978; Cozzzone, 1981). Bis heute ist unklar welche Mechanismen zu diesem uneinheitlichen Verhalten der Proteine führen. Jüngere Arbeiten (Spadaro et al., 1981; Cozzzone, 1981) ziehen sogar die zentrale Rolle von ppGpp bei der "Stringent Response" in Zweifel.

Ny et al. (1980) untersuchten acht Enzyme aus *E. coli*, die tRNA als Substrat verwenden. Sie fanden dabei, daß nur die m^5U -Methylase streng kontrolliert wird; d.h. nur dieses Enzym wird bei Aminosäuremangel wie die Elongationsfaktoren, bezogen auf die Gesamtproteinsynthese, vermindert gebildet.

In vitro kann die ribosomale Bildung von ppGpp bereits durch das Tetranukleotid T ψ CG ausgelöst werden - interessanterweise jedoch nicht durch UUCG (Sprinzl et al., 1976).

Diese Befunde lassen vermuten, daß die Modifikation des Uridins an Position 54 von tRNAs zu Ribosylthymidin an der Ausprägung der "Stringent Response" beteiligt sein könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das Fehlen dieser Methylierung folgende Prozesse beeinflußt:

- (i) die Hemmung der RNA-Synthese bei Aminosäuremangel in *E. coli* und *B. subtilis*
- (ii) die Veränderungen in der Syntheserate einzelner Proteine unter diesen Bedingungen in *E. coli*.

A.2.4.1. Einfluß von Ribosylthymin auf die Hemmbarkeit der Gesamtsynthese von Protein und RNA durch Aminosäuremangel in rel^+ -Stämmen

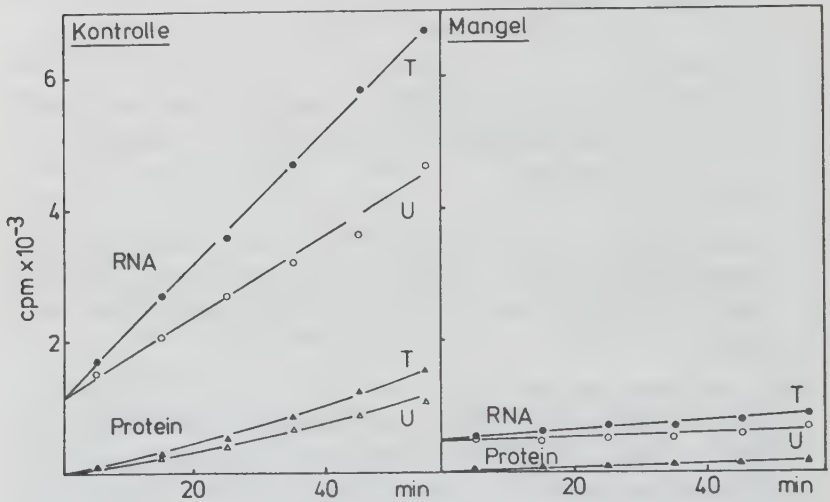
Teile des *ilv*-Operons sind in *E. coli* K12 und in davon abgeleiteten Stämmen so koordiniert reguliert, daß durch eine Zugabe von Valin zum Medium, ein Isoleucinmangel induziert werden kann (Zusammenfassung : Umbarger, 1969).

In den Stämmen GB1-5-41 (rel^+ , $trmA^+$ (=T54)) und GB1-5-753 (rel^+ , $trmA^-$ (=U54)) wurde unter diesen Bedingungen die Gesamtsyntheserate von RNA und Protein bestimmt. Zur Kontrolle dienten Kulturen, in denen der Aminosäuremangel durch Zusatz von Isoleucin zum Medium wieder aufgehoben worden war. Der gemessene Einbau von ^{14}C -Phenylalanin und 3H -Uridin war in jedem Fall in beiden Stämmen völlig gleich (auf eine Wiedergabe der Kurven wurde daher verzichtet).

Die Hemmung der Protein- und RNA-Synthese im Zuge der "Stringent Response" wird in *E. coli* also nicht davon beeinflusst, ob die tRNAs des betreffenden Stammes an Position 54 T oder U tragen. Mit diesem Ergebnis deckt sich die unveröffentlichte Beobachtung von Björk, daß die ppGpp-Spiegel in $trmA^+$ - und $trmA^-$ -Stämmen von *E. coli* bei Aminosäuremangel gleich stark erhöht sind.

Da sich die "Stringent Response" in *B. subtilis* in einigen Punkten von der in *E. coli* unterscheidet (die Synthese von ppGpp z.B. erfolgt ribosomenunabhängig), wurden ähnliche Versuche wie für *E. coli*, auch für *B. subtilis* W23 und BR19 durchgeführt (Abb. A.2.8: BR19). Der untersuchte Methioninmangel wurde, wie in A.1.3.3. beschrieben, durch Trimethoprimzusatz induziert. Auch in diesen Stämmen hat ein Fehlen von Ribosylthymin in der tRNA keine Auswirkung auf die Hemmbarkeit der RNA-Synthese durch den Aminosäuremangel.

Abb. A.2.8: Protein- und RNA-Synthese in *B. subtilis* BR19 (rel^+) bei Methioninmangel



B. subtilis BR19 wurde in Minimalmedium unter Zusatz folatabhängiger Metaboliten gezüchtet:

- , -△- : 10µg/ml Trimethoprim in Vor- und Hauptkultur (U54)
- , -▲- : kein Trimethoprim in Vor- und Hauptkultur (T54)

Bei $A_{578} = 0,4$ wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in einem Medium resuspendiert, das 10µg/ml Trimethoprim, sowie die folat-abhängigen Metaboliten außer Methionin enthielt (A.1.3.3.).

In den Kontrollkulturen (links) wurde der entstehende Aminosäure-mangel durch Zusatz von $10^{-4}M$ Methionin sofort wieder aufgehoben. 5 Minuten später wurde 3H -Uridin (62,5 Ci/mol, 5 µCi/ml) und ^{14}C -Phenylalanin (2 Ci/mol, 0,25 µCi/ml) zugegeben. (Zur Bestimmung der eingebauten Radioaktivität vgl. A.1.4.1., 1ml-Kulturen.)

-△- / -▲- : ^{14}C -Phenylalanin

-○- / -●- : 3H -Uridin

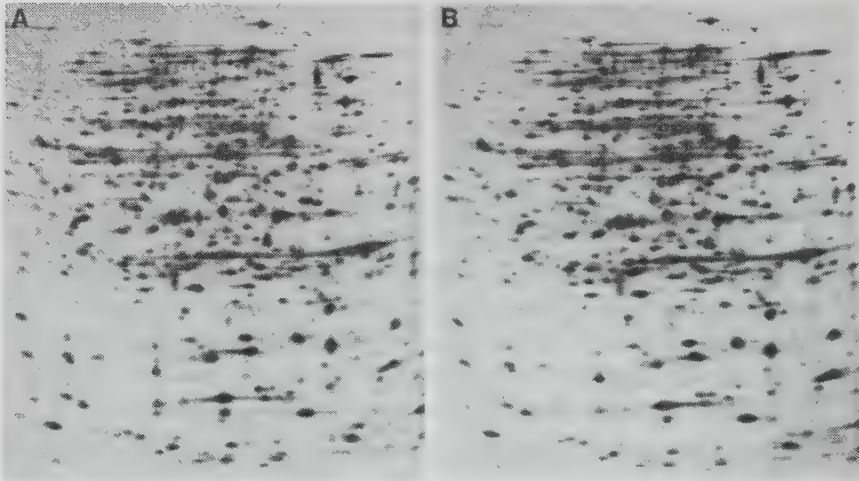
A.2.4.2. Relative Syntheseraten der Proteine in *E. coli* trmA^+ und trmA^- bei Isoleucinmangel

Die Gesamtsyntheserate von Protein während eines valininduzierten Isoleucinmangels ist in den Stämmen *E. coli* GB1-5-41 (rel^+ , trmA^+ (=T54)) und GB1-5-753 (rel^+ , trmA^- (=U54)) gleich (s. voriger Abschnitt). Dieser Befund schließt jedoch nicht aus, daß möglicherweise doch Unterschiede in der Syntheserate einzelner Proteine auftreten könnten.

Kulturen der obengenannten Stämme wurden deshalb 30 Minuten nach der Induktion des Aminosäuremangels 5 Minuten lang mit ^{35}S -Methionin markiert (A.1.4.2.). Die Zellen wurden geerntet und aufgeschossen, und die Proteine zweidimensional auf O'Farrell-Gelen aufgetrennt. Für die visuelle Auswertung wurden diese Gele dann 6, 20 und 100 Stunden auf Roentgenfilmen exponiert. In Abb. A.2.9 sind Autoradiographien mit einer Expositionszeit von 100 Stunden gezeigt.

Insgesamt war es möglich, die Syntheserate von mehr als 500 Proteinen - das ist etwa die Hälfte aller Proteine von *E. coli* - in den beiden Stämmen zu vergleichen. Es konnte kein einziges Protein gefunden werden, dessen Syntheserate unter Isoleucinmangel durch die An- oder Abwesenheit von Ribosylthymine in den tRNAs signifikant verändert wurde. Auch die nicht gezeigten Proteilmuster der Kontrollkulturen ohne Valinzugabe waren absolut identisch.

Abb. A.2.9: 2D-Gelelektrophorese: Während eines Isoleucinmangels mit ^{35}S -Methionin markierte Proteine von *E. coli* rel^+ -Stämmen



Die Kulturen wurden bei einer Dichte von 1×10^8 Zellen/ml mit $400 \mu\text{g/ml}$ Valin versetzt. Nach 30 min Inkubation wurde 5 min mit ^{35}S -Methionin markiert.

- A) T54: GB1-5-41 (rel^+ , trmA^+)
- B) U54: GB1-5-753 (rel^+ , trmA^-)

Zwischen den Proteinmustern der Stämme konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

A.3. DISKUSSION

Eine der höchstkonservierten Modifikationen in Transfer-Ribonucleinsäuren (tRNA) ist die Methylierung des Uridins an Position 54 zu Ribosylthymine (Gauss und Sprinzl, 1983). Die Bedeutung dieses Nucleosids wird dadurch unterstrichen, daß es zwei Wege für seine Biosynthese gibt: In gram-positiven Bakterien wird es mit Tetrahydrofolat als Coenzym gebildet (Schmidt, Arnold und Kersten, 1977), in gram-negativen Bakterien und Eukaryonten dagegen, ist S-Adenosyl-Methionin der Methylgruppendonor (Mandel und Borek, 1963). Fehlt das modifizierende Enzym, die m^5 -U-Methylase in *E. coli* (Genotyp $trmA^-$), so ist der betreffende Stamm bei stärkerem Selektionsdruck gegenüber dem Wildtyp ($trmA^+$) im Nachteil: Er wird in Mischkulturen von diesem überwachsen (Björk und Neidhardt, 1975) und besitzt auf Minimalagarplatten eine geringere Überlebensfähigkeit als dieser (Albani, 1979).

Bisher konnten in intakten Zellen noch keine biochemischen Veränderungen gefunden werden, die dieses Verhalten erklären könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine von Björk und Neidhardt (1975) und Albani (1979) diskutierte Hypothese untersucht, die besagt, daß der selektive Vorteil der Stämme mit T an Position 54 der tRNAs erst während der stationären Phase zum Tragen kommen könnte. Die relativen Mengen etwa eines Viertels aller Proteine aus $trmA^+$ - und $trmA^-$ -Stämmen von *E. coli*, wurden hierzu nach zweidimensionaler Gelelektrophorese miteinander verglichen. Vom Ende des logarithmischen Wachstums bis zur 24 Stunden stationären Phase waren keine Unterschiede zwischen den Proteinmustern der Stämme feststellbar, die mit der Modifikation an Position 54 korreliert werden konnten. Mit der verwendeten Methode konnten also während dieser Stadien keine größeren Veränderungen im Gehalt einzelner Enzymsysteme gefunden werden, die für die höhere Überlebensfähigkeit des T-haltigen Stammes verantwortlich sein könnten.

Ribosylthymidin und die Genauigkeit der Proteinsynthese

Während Versuche mit *E. coli* Mutanten, denen die m^5U -Methylase fehlt, in intakten Zellen seit 1971 keine weiteren Anhaltspunkte zur Aufklärung der funktionellen Rolle von Ribosylthymidin in diesem Organismus brachten, konnte unsere Arbeitsgruppe in den letzten Jahren eine Reihe signifikanter Effekte dieser Modifikation in in-vitro-Systemen nachweisen.

Einer der interessantesten war dabei der Einfluß auf die Fehlerraten bei der Elongation der poly(U)-codierten Polyphenylalaninsynthese: Die Fehlinkorporation von Leucin ist etwa zehnfach erhöht, wenn in den beteiligten tRNAs, $tRNA^{Phe}$ und $tRNA^{Leu}$ die Methylierung des Uridins an Position 54 fehlt (Kersten et al., 1981).

In intakten Zellen wurden Auswirkungen von Ribosylthymidin auf die Genauigkeit der Translation bisher nur für die Termination der Proteinsynthese mit Hilfe von Nonsense-Mutanten von T-Phagen untersucht. Die getesteten $trmA^+(=T54)$ - und $trmA^-(=U54)$ -Stämme von *E. coli* zeigten identische Suppressionsmuster (Björk und Neidhardt, 1975).

In den hier vorgestellten Experimenten wurde erstmals, der Einfluß von Ribosylthymidin auf Elongationsfehler in intakten *E. coli*-Zellen gemessen. Die Bestimmung basiert auf einem Modell von O'Farrell (1978), das die bei Aminosäuremangel extrem erhöhten Fehlerraten in *E. coli*-Stämmen, denen die "Stringent Response" fehlt (rel^-), durch den Substratmangel erklärt: An Codons, die zu der limitierenden Aminosäure gehören, verlängert sich die "Suchzeit" nach einer passenden beladenen tRNA; proportional dazu erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, daß eine zu einem verwandten Codon gehörige Aminosäure eingebaut wird.

Ein definierter Aminosäuremangel (d.h. definierte "Suchzeit") kann hiernach dazu verwendet werden, die schwer bestimmbar Grundfehler der Zelle bei der Translation, auf meßbare Werte anzuheben (vgl. A.2.3.2.).

In zwei isogenen Stämmen von *E. coli* (his^- , rel^-), von denen der eine im Gen der m^5U -Methylase mutiert ist ($trmA^-$), wurde der Glutaminfehleinbau bei definiertem Histidinmangel untersucht. Die als Inhomogenität im isoelektrischen Punkt der Proteine sichtbaren Fehler (Parker et al., 1978, O'Farrell, 1978) waren in beiden Stämmen

gleich. Nach dem oben beschriebenen Modell, muß hieraus gefolgert werden, daß die An- bzw. Abwesenheit von Ribosylthymine in $tRNA^{His}$ und $tRNA^{Gln}$, den zellulären Grundfehler beim Lesen von Histidincodons nicht beeinflusst.

Prinzipiell kann es für diese Beobachtung zwei Erklärungen geben: Zum einen wäre es möglich, daß die intrazellulären Verhältnisse in *E. coli* (Ionenbedingungen, Kontrollmechanismen) es generell verhindern, daß sich ein Fehlen dieser Modifikation auf die Genauigkeit der Proteinsynthese auswirkt. Zum anderen wäre es aber auch denkbar, daß der in vitro gemessene Leucin/Phenylalanin-Fehler $tRNA$ -spezifisch ist, d.h., daß die Abwesenheit von Ribosylthymine nur bei bestimmten $tRNAs$ die Genauigkeit der Elongation verringert. Da es zur Zeit noch keine Methode gibt, den Fehleinbau von Leucin intrazellulär in *E. coli* zu messen, ist eine direkte Überprüfung dieser Hypothese nicht möglich.

Eine Reihe von Versuchsergebnissen unserer Arbeitsgruppe zeigte bereits in vitro, daß die Auswirkungen der Modifikation von U54 zu T54 in verschiedenen Translationssystemen aus *E. coli* nicht einheitlich sind:

Die Rate der poly(A)-codierten Homopeptidsynthese ist erniedrigt, wenn die eingesetzte $tRNA^{Lys}$ Ribosylthymine besitzt; $tRNA^{Phe}$ dagegen translatiert im poly(U)-System effizienter, wenn sie an Position 54 methyliert ist (Kersten et al., 1981; Praisler et al., 1981).

Eine nähere Untersuchung der bereits angesprochenen Leucin-Fehl-inkorporation im poly(U)/poly(Phe)-System wurde mit Hilfe gereinigter spezifischer $tRNA$ -Isoakzeptoren durchgeführt. Kreuzexperimente zeigten, daß die Fehlerrate dann am höchsten ist, wenn beide Partner, d.h. die für die Leucin-Inkorporation verantwortliche $tRNA_4^{Leu}$ und die $tRNA^{Phe}$, an Position 54 ein unmodifiziertes Uridin tragen.

Dieser Befund kann so interpretiert werden, daß das Fehlen der Modifikation Ribosylthymine die Translationseffizienz von $tRNA_4^{Leu}$ erhöht, während es die Effizienz von $tRNA^{Phe}$ vermindert.

Bei der Messung des Fehleinbaus von Leucin in Polyphenylalanin im poly(U)-System werden $tRNA^{Phe}$ und $tRNA^{Leu}$ direkt verglichen. Die in den Kreuzexperimenten mit $tRNA^{Phe}(T54)$, $tRNA_4^{Leu}(T54)$, $tRNA^{Phe}(U54)$ und $tRNA_4^{Leu}(U54)$ gemessenen Fehlerraten zeigen deshalb, daß tatsächlich

die Eigenschaften verschiedener tRNA-Spezies von der Methylierung an Position 54 unterschiedlich beeinflußt werden. (Die gegensätzlichen Auswirkungen von Ribosylthymine auf die Translationseffizienz von tRNA^{Lys} bzw. tRNA^{Phe} könnten, isoliert betrachtet, auch allein durch die unterschiedlichen Bedingungen bei der poly(A)-abhängigen poly(Lys)- und der poly(U)-abhängigen poly(Phe)-Synthese erklärt werden.)

Tab. A.3.1: Folgen der fehlenden Methylgruppe an U54

	T54→U54	Quelle
<u>Translationseffizienz der tRNA</u>		
poly(A)/poly(Lys)	erhöht	Kersten et al., 1981
poly(U)/poly(Phe)	erniedrigt	Praisler, 1984
<u>Leucin-Fehleinbau (poly(U))</u>		
Gesamt-tRNA	erhöht	Kersten et al., 1981
tRNA ^{Phe}	erhöht	Praisler, 1984
tRNA ^{Leu} ₄	erhöht	
<u>A-Seiten-Wechselwirkung</u>	erniedrigt	Kersten et al., 1981
<u>Schmelzpunkt der tRNA</u>	erniedrigt	Davanloo et al., 1979, Albani, 1979

Hinweise auf eine Erklärung der in Tabelle A.3.1 nochmals zusammengefaßten Unterschiede im Einfluß der Methylierung an Position 54 könnten zwei weitere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe geben:

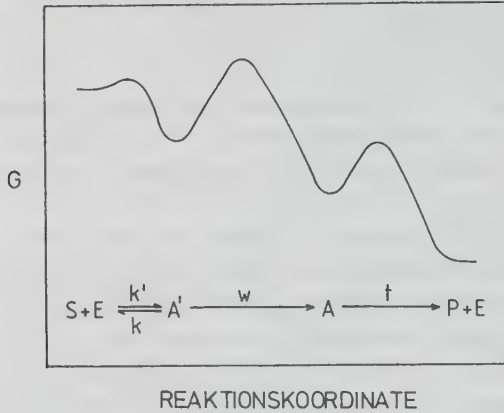
- (i) tRNAs zeigen eine stärkere Wechselwirkung mit der ribosomalen A-Seite, wenn sie Ribosylthymine statt Uridine in der TΨC-Sequenz tragen (Kersten et al., 1981: Die P-Seite von poly(A)-programmierten E. coli-Ribosomen wurde mit Deacyl-tRNA abgesättigt. Die Menge an Ac-Lys-tRNA^{Lys} mit T54 bzw. U54, die unter diesen Bedingungen in die noch freie A-Seite bindet, wurde wie von Watanabe (1972) beschrieben bestimmt: Nach Translokation der Ac-Lys-tRNA^{Lys} in die P-Seite durch Zugabe von Elongationsfaktor G wurde der radioaktiv markierte Ac-Lys-Rest auf Puromycin übertragen (Peptidyltransferase-Reaktion) und schließlich die Menge des gebildeten Acetyl-Lysin-Puromycin gemessen.).

- (ii) Die Modifikation von Uridin an Position 54 zu Ribosylthymidin erhöht die Stabilität der tertiären Struktur der tRNAs, wie aus dem Schmelzverhalten von tRNA^{Lys}, tRNA^{Phe} (Albani, 1979) und tRNA^{Met}_f (Davanloo et al., 1979) aus E. coli zu schließen ist.

Könnten diese beiden Beobachtungen in der Theorie allein bereits ausreichen, die beschriebenen Effekte von Ribosylthymidin auf die Translation (zusgef. in Tab.A.3.1) zu erklären? Um diese Frage zu beantworten, wurde mit Hilfe von Literaturdaten ein Modell zur Proteinbiosynthese erstellt und rechnerisch näher untersucht. Grundlage für dieses Modell ist folgende Vorstellung: Eine passende Aminoacyl-tRNA wird am programmierten Ribosom zunächst als ternärer Komplex AA-tRNA·EF_{TU}·GTP an das Codon in der A-Seite gebunden. Durch die Wechselwirkung mit dem Codon wird eine Konformationsänderung der tRNA induziert, die die TΨCG-Sequenz besser zugänglich macht (Schwarz et al., 1974 und 1976; Wagner und Garret, 1979; Gassen, 1980; Labuda und Pörschke, 1980; Gorenstein und Goldfield, 1982). Nach den gängigen Anschauungen ermöglicht dies eine Basenpaarung von TΨCG mit einer komplementären Sequenz in ribosomaler RNA (Erdmann et al., 1980), durch die die Bindung der AA-tRNA in die A-Seite praktisch irreversibel wird (Gassen, 1982). (Der Komplex EF_{TU}·GDP muß bereits vorher freigesetzt worden sein (Hopfield und Yamane, 1980)).

Die Diskrimination zwischen einer "richtigen" und einer "falschen" tRNA erfolgt während dieser Abläufe aufgrund der Unterschiede in der Stärke der Codon-Anticodon-Wechselwirkungen. Eine mittlere Basenpaarungsenergie von 12 kJ/Mol (Borer et al., 1974) erlaubt thermodynamisch Fehlerraten bis herab zu etwa 10^{-2} , wenn zwei tRNAs nur in einer Anticodonbase differieren. Nach einem von Hopfield vorgeschlagenen Modell, können die in der Zelle und in vitro tatsächlich gemessenen Fehler von 10^{-4} dadurch erklärt werden, daß das gleiche Unterscheidungskriterium, der Energieinhalt der Codon-Anticodon-Wechselwirkung, zweimal hintereinander ausgewertet wird (Genauigkeit: $10^{-2} \times 10^{-2}$). Dies ist möglich, wenn die beiden diskriminierenden Reaktionen voneinander unabhängig ablaufen, d.h. wenn sie durch einen irreversiblen Schritt (z.B. die GTP-Hydrolyse im ternären Komplex) voneinander getrennt sind ("Proofreading-Modell", Übersicht: Hopfield und Yamane, 1980).

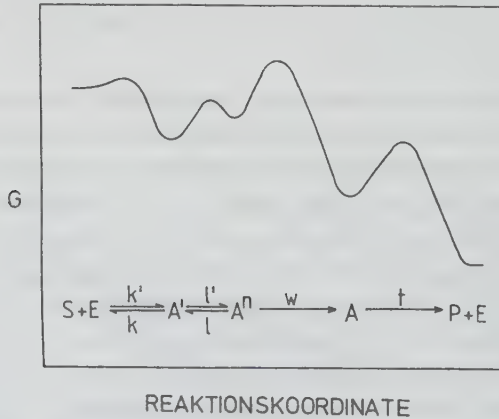
Abb. A.3.1: Grundmodell zur Proteinsynthese
(Hopfield und Yamane, 1980)



A': Codon-Anticodon-Interaktion

A : Bindung der tRNA in die A-Seite des Ribosoms

Abb. A.3.2: Erweitertes Modell zur Proteinsynthese
(Ott et al., 1982b)



A': Codon-Anticodon-Interaktion

Aⁿ: Zwischenzustand: Interaktion zwischen tRNA und Ribosom vor der endgültigen Bindung in die A-Seite

A : Bindung in die A-Seite

Abbildung A.3.1 zeigt das Energiediagramm eines einfachen Grundmodells der Proteinsynthese, in dem die Vorgänge bis zur Bindung der tRNA in die A-Seite des Ribosoms (ohne "Proofreading") zusammengefaßt sind (Hopfield und Yamane, 1980). Bezieht man in dieses Schema Veränderungen in der Konformation einer tRNA ("Conformational-Stage-Theorie") mit ein, so kommt man zu einem erweiterten Modell der ribosomalen tRNA-Selektion (Abb. A.3.2):

Die Geschwindigkeit, mit der zwei tRNAs, die sich nur im Anticodon unterscheiden, an das programmierte Ribosom diffundieren, ist unabhängig davon, ob es sich um die "richtige" oder um die "falsche" tRNA handelt (Geschwindigkeitskonstante k'). Eine Diskrimination erfolgt erst durch die Rückreaktion - die Geschwindigkeit der Abdissoziation einer tRNA vom Codon (k) hängt von der Anzahl und der Stärke der ausgebildeten Basenpaarungen ab. Um die Fehlerrate der Proteinsynthese durch diesen Schritt möglichst gering zu halten, ist es erforderlich, daß die konkurrierende Bindung der tRNAs in die A-Seite, die nicht mehr zwischen "richtigen" und "falschen" tRNAs unterscheidet, nicht zu rasch erfolgt (Geschwindigkeitskonstante w). Die dafür benötigte Aktivierungsenergie (ΔG_w in Abb. A.3.1), die nach der "Conformational-Stage-Theorie" hauptsächlich dazu verwendet wird, die tRNA in eine bindende Konformation zu überführen (Labuda und Poerschke, 1980), darf also nicht zu niedrig sein.

Das in Abbildung A.3.2 gezeigte Energiediagramm ist an dieser Stelle gegenüber dem aus der Literatur bekannten Schema um einen Schritt erweitert: Nach den ersten codoninduzierten Konformationsänderungen der tRNA und vor der endgültigen Bindung in die A-Seite des Ribosoms (A) wurde ein Zwischenzustand A^n postuliert, in dem die tRNA bereits locker an das Ribosom gebunden ist. Diese Annahme beruht auf der Überlegung, daß es - in Analogie zu anderen enzymatisch katalysierten Vorgängen - unwahrscheinlich ist, daß die gesamte Konformationsänderung einer tRNA in einem Schritt erfolgt, noch bevor die ersten Wechselwirkungen mit der A-Seite des Ribosoms stattfinden.

Experimente der Arbeitsgruppe Gassen zeigten, daß schon die bloße Reaktion einer tRNA mit einem Codon in Lösung, die T ψ CG-Sequenz besser zugänglich macht (Schwarz et al., 1976; Möller et al., 1979). A^n soll deshalb einen Bindungszustand beschreiben, in dem bereits Basenpaarungen dieses Tetranukleotids mit der komplementären Sequenz

in der ribosomalen RNA enthalten sind. Von Veränderungen in der TWCG-Sequenz ist unter diesen Umständen zu erwarten, daß sie sich auf den Zwischenzustand A^n ähnlich auswirken, wie auf die endgültige Bindung einer tRNA in die A-Seite.

Für die Methylierung des Uridins an Position 54 der tRNAs zu Ribosylthymine heißt das - dieses Modell vorausgesetzt -, daß die zusätzliche Methylgruppe, die zu einer festeren Bindung der tRNA in die A-Seite führt (s.o. (i)), auch die Stabilität des intermediären Komplexes A^n erhöht. Der Betrag, um den die bei der Bildung von A^n freiwerdende Energie (ΔG_1) durch die Anwesenheit dieser Modifikation erhöht wird, sollte für alle tRNAs praktisch gleich sein, da stets die gleiche, hochkonservierte Sequenz TWCG betroffen ist.

Die beobachtete Stabilisierung der tRNA-Konformation durch Ribosylthymine (s.o. (ii)) beeinflußt das Verhalten einer tRNA im vorgestellten Modell ebenfalls: Die zur Bindung in die A-Seite erforderlichen Konformationsänderungen erfolgen bei (T54)-tRNAs langsamer als bei (U54)-tRNAs. (Aus Gründen einer rechnerischen Vereinfachung wurden die von dieser Modifikation abhängigen Konformationsänderungen in ΔG_1 zusammengefaßt, so daß ΔG_w davon unabhängig ist.)

Es ist anzunehmen, daß der Umfang, in dem die Methylierung an Position 54 die Stabilität größerer tRNA-Bezirke verändert, erheblich von spezifischen Strukturelementen der jeweiligen tRNA abhängt; die resultierende Erhöhung von ΔG_1 sollte deshalb von tRNA-Spezies zu tRNA-Spezies verschieden sein.

Die Methylierung des Uridins an Position 54 zu Ribosylthymine hätte somit zwei gegenläufige Effekte auf die Effizienz einer tRNA in der Proteinsynthese: Zum einen wird, wahrscheinlich für alle tRNAs im gleichen Umfang, die Energieausbeute bei der Bildung des Zwischenzustandes A^n erhöht - zum andern wird aber, abhängig von der tRNA-Spezies, die zur Bindung in die A-Seite erforderliche Konformationsänderung erschwert.

Die Summe der beiden Effekte könnte die gegensätzlichen Auswirkungen der Modifikation Ribosylthymine auf das Verhalten von $tRNA^{Lys}$, $tRNA_4^{Leu}$ und $tRNA^{Phe}$ in verschiedenen in-vitro-Systemen erklären.

Eine rechnerische Untersuchung des vorgestellten Modells sollte klären, ob die hierfür erforderlichen Veränderungen in den einzelnen

ΔG -Werten in einem Bereich liegen, der bei der Einführung einer einzigen Methylgruppe möglich wäre. (Die abgeleiteten Formeln, sowie ausführliche Tabellen mit den errechneten Ergebnissen sind im Anhang zu dieser Diskussion aufgeführt.)

Es wurde angenommen, daß ein Fehlen der Methylgruppe am Uridin 54 bei allen Elongations-tRNAs von *E. coli* die Energieausbeute (ΔG_1) der Bindung an die komplementäre Sequenz in der ribosomalen RNA (A^n) um 3 kJ/Mol (= 1/4 Basenpaar) erniedrigt. Die unter dieser Voraussetzung errechneten Daten entsprechen den experimentell gefundenen, wenn gleichzeitig die zur Konformationsänderung notwendige Energie ΔG_1 für tRNA^{Lys} und tRNA^{Leu}₄ um 4 kJ/Mol (= 1/3 Basenpaar), für tRNA^{Phe} dagegen nur um 1 kJ/Mol sinkt. D.h. alle bisher mit Hilfe von in-vitro-Systemen gewonnenen Ergebnisse sind nach dem vorgestellten Modell bereits durch Veränderungen in den Aktivierungsenergien ΔG_1 und ΔG_1 zu erklären, die bei höchstens einem Drittel einer einzigen Basenpaarung liegen.

Die geforderten geringen Energiebeträge liegen somit in einem Bereich, der bei der Einführung einer Methylgruppe zu erwarten ist. Sie könnten die Hypothese bestätigen, daß modifizierte Nucleoside zur Modulation des Proteinbiosyntheseapparates dienen. Ob geringe Veränderungen der Geschwindigkeit und Genauigkeit der Proteinsynthese im Fall von Ribosylthymine aber den Überlebensvorteil des Wildtyps von *E. coli* mit tRNA(T54) gegenüber der Mutante mit tRNA(U54) hinreichend erklären können, sei dahingestellt.

Ribosylthymine und die Regulation der Genexpression

Während in *E. coli* alle tRNAs im Hinblick auf Ribosylthymine voll modifiziert sind, werden in der Hauptklasse der eukaryontischen tRNAs (Klasse C nach Roe et al., 1976) variiierende submolare Mengen von Uridin bzw. Ribosylthymine gefunden. Da sich eine vollständige Methylierung dieser tRNAs an Position 54 positiv auf die Proteinsynthese im zellfreien System auswirkt (tRNA^{Phe} : Roe und Tsen, 1977), wurde von Roe und Tsen vermutet, daß das Ausmaß dieser Modifikation für die Regulation der Genexpression auf der Translationsebene von Bedeutung ist. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung unserer Arbeitsgruppe, daß im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* in der

Hauptklasse tRNAs mit T anstelle von U54 an den Polysomen bevorzugt verwendet werden (Dingermann et al., 1980).

Der Befund, daß tRNAs, die in Eukaryonten ausschließlich Uridin an Position 54 tragen (Klasse D), in der in-vitro-Proteinsynthese weniger aktiv sind, wenn das Uridin methyliert wird (tRNA^{Gly} : Marcu und Dudock, 1976), deutet darauf hin, daß die Methylgruppe auch in Eukaryonten, abhängig von der jeweiligen Struktur der tRNA, gegensätzliche Effekte hervorrufen kann.

Da der Gehalt von Ribosylthymine in den Elongations-tRNAs von *E. coli* nicht meßbar schwankt, ist in diesem Organismus eine Regulation analog der in Eukaryonten postulierten nicht möglich.

Einen Hinweis auf eine denkbare regulatorische Funktion dieser Modifikation in *E. coli* könnte die Beobachtung von Sprinzl et al. (1976) geben, daß die ribosomale Synthese von Guanosintetraphosphat (ppGpp) in vitro durch das Tetranukleotid T₄CG ausgelöst werden kann, nicht aber durch UUCG. Dieses ppGpp ist das Mediatormolekül einer als "Stringent Response" bezeichneten Regulation in *E. coli*, die bei Aminosäuremangel spezifisch die Genexpression auf der Translations- und Transkriptionsebene verändert. Das modifizierende Enzym selbst, die m⁵U-Methylase, ist in *E. coli* streng an die Synthese stabiler RNA gekoppelt, d.h. es gehorcht der "Stringent Response", im Gegensatz zu sieben weiteren von Ny et al. (1980) untersuchten Enzymen, die ebenfalls tRNA als Substrat verwenden.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß in streng kontrollierten Stämmen von *E. coli* das Fehlen der Modifikation Ribosylthymine keinen signifikanten Einfluß auf die Expression von mehr als 500 Proteinen während einer durch Aminosäuremangel ausgelösten "Stringent Response" hat. Ob möglicherweise die Expression einzelner tRNA- oder rRNA-Gene unter diesen Bedingungen verändert ist, müßte erst durch weitere Versuche geklärt werden.

Neue Aspekte zur regulatorischen Funktion von Ribosylthymine (und zum Zusammenhang mit der "Stringent Response") haben sich aus jüngsten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergeben: Bei der Translation von MS2-Phagen-RNA in vitro ist eine Initiation mit unformylierter Initiations-tRNA nur dann möglich, wenn der tRNA gleichzeitig die Methylierung an Position 54 fehlt (Männlein, 1983). Eine Initia-

tions-tRNA ($\text{tRNA}_2^{\text{fMet}}$), die an Position 54 (und an Position 8 statt s^4U) ein unmodifiziertes Uridin trägt, wurde in einem aminosäure-auxotrophen Stamm von *E. coli*, dessen Elongations-tRNAs im Hinblick auf T voll modifiziert sind, neben der "normalen" T-haltigen $\text{tRNA}_1^{\text{fMet}}$ gefunden (Praisler, 1984).

Diese $\text{tRNA}_2^{\text{fMet}}$ könnte von zentraler Bedeutung für eine Regulation sein, die bei Tetrahydrofolatmangel die "Stringent Response" ergänzt (Kersten, 1984): Eine fehlende Formylierung der untermodifizierten Initiations-tRNA löst die ribosomale Bildung von ppGpp aus. Von Debenham et al. (1980) wurde beschrieben, daß formylierte $\text{fMet-tRNA}^{\text{fMet}}$ an die RNA-Polymerase binden und deren Promotorspezifität ähnlich wie ppGpp verändern kann. Da formylierte $\text{fMet-tRNA}^{\text{fMet}}$ bei einem Stopp der Proteinsynthese nur dann akkumulieren kann, wenn ausreichend Tetrahydrofolat vorhanden ist, könnten bei Tetrahydrofolatmangel noch einige mRNAs transkribiert werden. Die $\text{tRNA}_2^{\text{fMet}}$ würde unter diesen Bedingungen die Translation dieser mRNAs und damit die Expression eines bestimmten Satzes von Proteinen ermöglichen. Ein Wechselspiel zwischen dem hemmenden Effekt von ppGpp auf die Transkription und dem stimulierenden Effekt der $\text{tRNA}_2^{\text{fMet}}$ auf die Translation könnte die Zelle an einen Tetrahydrofolatmangel optimal anpassen (Kersten, 1984).

A.4. ANHANG ZUR DISKUSSION

Im vorstehenden Abschnitt wurde die funktionelle Rolle von Ribosyl-thymin (T54) in den tRNAs von E. coli diskutiert, und dabei ein erweitertes Modell zur Proteinbiosynthese vorgestellt. Dieser Anhang enthält die verwendeten Gleichungen, sowie zwei Tabellen mit den, bei den Berechnungen eingesetzten und erhaltenen Werten.

Die Berechnungen basierten auf folgenden Gleichungen:

$$f = \frac{w_B k_B' l_B'}{w_A k_A' l_A'} \cdot \frac{k_A l_A + w_A l_A' + w_A k_A}{k_B l_B + w_B l_B' + w_B k_B}$$

$$\frac{v}{E_t} = \frac{t l' w k' S}{t k l + w l' t + w k t + S k' t l + S k' w t + S k' l' t + S k' l' w}$$

- E_t : Konzentration der Ribosomen
- S : Konzentration des Substrates Aminoacyl-tRNA
- A : "richtiges" Substrat
- B : "falsches" Substrat
- f : Fehlerrate
- v : Geschwindigkeit der Produktbildung

Diese Formeln sind Erweiterungen der bei Hopfield und Yamane (1980) aufgeführten Gleichungen. Da der Einfluß von Variationen in den einzelnen Aktivierungsenergien (und damit über die Eyring-Formel, in den einzelnen Geschwindigkeitskonstanten) mit Hilfe eines programmierbaren Rechners untersucht wurde, konnte auf eine weitere Vereinfachung, mit den dann notwendigen Fallunterscheidungen verzichtet werden.

Die Tabellen A.4.1 und A.4.2 zeigen Kombinationen der Aktivierungsenergien, die, eingesetzt in diese Formeln, Resultate für v und f ergeben, die den experimentell gefundenen Werten entsprechen. Die absoluten Werte dieser Energien können in großem Umfang variiert werden, wenn nur die Bindung in die endgültige A-Seite langsam genug erfolgt, d.h. wenn das System mit einer "vernünftigen" Genauigkeit arbeitet. Voraussetzung dafür, daß die betrachteten Vorgänge die Gesamtgeschwindigkeit der Elongation beeinflussen können (Tab. A.4.1) ist natürlich, daß die Bindung in die A-Seite ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist.

Tab. A.4.1: Translationseffizienz von (U54)- und (T54)-tRNAs in verschiedenen in-vitro-Systemen

tRNA	Aktivierungsenergien (kJ/Mol)						$\frac{v_{\max}}{E_t} (s^{-1})$	$\frac{v_{\max}}{v_{\max}(T54)}$
	ΔG_k	ΔG_k	ΔG_l	ΔG_l	ΔG_w	ΔG_t		
Phe(T54)	5	36	25	12	35	30	$2,38 \times 10^4$	1
Lys(T54)								
Lys(U54)	5	36	24	9	35	30	$1,07 \times 10^4$	0,45
Phe(U54)	5	36	21	9	35	30	$3,56 \times 10^4$	1,38

Experimentelle Daten (Kersten et al., 1981; Praisler, 1984):

Effizienz im poly(A)-System: $tRNA^{Lys}(U54) / tRNA^{Lys}(T54)$ etwa 2 / 1

Effizienz im poly(U)-System: $tRNA^{Phe}(U54) / tRNA^{Phe}(T54)$ etwa 0,5 / 1

Tab. A.4.2: Fehlerrate im poly(U)-System - Kreuzexperimente mit $tRNA^{Phe}$ - und $tRNA_4^{Leu}$ -Isoakzeptoren

tRNA	Aktivierungsenergien (kJ/Mol)								Fehler- raten (f)	f
	tRNA ^{Phe}				tRNA ^{Lys}					
	ΔG_k	ΔG_l	ΔG_l	ΔG_w	ΔG_k	ΔG_l	ΔG_l	ΔG_w		
Phe(T54)+ Leu(T54)	36	25	12	35	24	25	12	35	$7,94 \times 10^{-3}$	1
Phe(T54)+ Leu(U54)	36	25	12	35	24	21	9	35	$1,18 \times 10^{-2}$	1,49
Phe(U54)+ Leu(T54)	36	24	9	35	24	25	12	35	$1,77 \times 10^{-2}$	2,23
Phe(U54)+ Leu(U54)	36	24	9	35	24	21	9	35	$2,65 \times 10^{-2}$	3,34

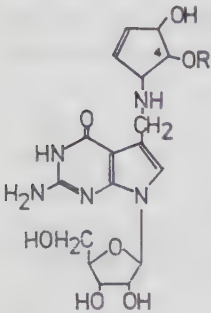
Experimentelle Daten (Praisler, 1984):

Fehlerrate: $tRNA^{Phe}(U54) + tRNA_4^{Leu}(U54) / tRNA^{Phe}(T54) + tRNA_4^{Leu}(T54)$
etwa 3 / 1

Teil B: Queuosin in Dictyostelium discoideum

B.O. EINLEITUNG

Queuosin und seine Derivate



Die für Asparagin, Asparaginsäure, Histidin und Tyrosin spezifischen tRNAs tragen in Eubakterien und in Eukaryonten (außer Hefe) an der ersten Position des Anticodons das 7-Deazaguanosinderivat Queuosin (Q; R=H) ("Q-Familie" der tRNAs, vgl. Gauss und Sprinzl, 1983). Die Base Queuin wird von höheren Organismen mit der Nahrung aufgenommen (Katze et al., 1982) und im Austausch gegen Guanin in einer Transglycosylase-Reaktion in die tRNAs eingeführt (Katze und Farkas, 1979; Shindo-Okada et al., 1980). In eukaryontischer tRNA^{Asp} und tRNA^{Tyr} kann dieses Nucleosid noch an der 4-Hydroxylgruppe des Cyclopentendiolringes glycosyliert werden, wobei als Zuckerreste (R) Mannose (bei tRNA^{Asp}) und Galactose (bei tRNA^{Tyr}) in diesen mit Q* bezeichneten Verbindungen gefunden werden (Kasai et al., 1976).

Bereits etwa 10 Jahre vor der Strukturaufklärung von Queuosin (Kasai et al., 1975b) wurden die tRNAs der Q-Familie mit regulatorischen Prozessen in Verbindung gebracht, da Veränderungen im Muster ihrer Isoakzeptoren in Tumorgewebe beobachtet wurden (tRNA^{Tyr}: Taylor et al., 1967). Neuere Arbeiten zeigen, daß der Q-Gehalt eukaryontischer tRNAs von der Ernährung des Organismus abhängt (Jacobson, 1978) und stark während des Alterns (Hosbach und Kubli, 1979; Owenby et al., 1979; Singhal et al., 1981) und der Differenzierung von Geweben (Shindo-Okada et al., 1981; Lin et al., 1980) variiert. In unserem Arbeitskreis wurde eine Korrelation zwischen der Q-Defizienz der tRNAs und der Malignität verschiedener Tumoren gefunden (Zubrod, 1982). Mutanten von Zahnkarpfen (*Xiphophorus*, ein genetisch gut definiertes experimentelles Krebsystem) enthalten dann vermehrt tRNAs mit G34, wenn ihnen das Gen R_{Diff} fehlt, das die Ausbildung maligner Tumoren verhindert (Kersten et al., 1983). Beim Schleimpilz *D. discoideum* variiert der Gehalt an Q-defizienter tRNA während des Entwicklungszyklus (Pistel, 1982).

Die Ursache für die beobachteten Veränderungen im Q-Gehalt von tRNAs

konnte bisher weder durch eine Messung der Transglycosylase-Aktivität in Tumorgewebe (Shindo-Okada et al., 1980), noch durch eine Bestimmung der Pteridiningehalte Q-defizienter Zellen (Hemmstoffe der Transglycosylase, Jacobson et al., 1981) befriedigend geklärt werden. In unserem Arbeitskreis wurde gezeigt, daß auch ein Mangel des Substrates Queuin nicht die generelle Ursache für die Q-Defizienz der TumortRNAs sein kann (Zubrod, Ott, Kersten, 1983).

Für zwei tRNAs wurden bisher Veränderungen ihrer Funktion bei der Proteinbiosynthese beschrieben, die durch die An- bzw. Abwesenheit der Modifikation Q bedingt werden:

- Das $v_{\max}$ der Aminoacylierung ist für (G34)tRNA^{Asp} niedriger und der K_m -Wert gleichzeitig höher als für die modifizierte tRNA (Singhal und Vakharia, 1983).
- (G34)tRNA^{Tyr} aus *Drosophila* kann im Gegensatz zur Q-haltigen tRNA ein Stoppcodon in der TMV-RNA supprimieren (Bienz und Kubli, 1981).

Ein interessanter Zusammenhang zwischen Ribosylthymidin und Queuosin ergibt sich aus jüngsten Untersuchungen der Arbeitsgruppe Kubli (persönl. Mittlg.): Sehr wahrscheinlich beruht die Suppressoreigenschaft einer Q-haltigen tRNA^{Tyr} aus *Drosophila* su(s)² auf einem Fehlen der Methylierung des Uridins an Position 54. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, daß auch Veränderungen des Gehaltes an Ribosylthymidin während der Entwicklung von *D. discoideum* (Dingermann et al., 1979 und 1980) und *Acetabularia mediterranea* (Schmidt et al., 1977b) auftreten.

Als Modellsysteme zur Untersuchung der funktionellen Rolle von Q in intakten Zellen standen bisher LM-Zellkulturen (Mäusefibroblasten; Katze, 1978) und seit kurzem auch transglycosylasedefiziente Mutanten von *E. coli* (tgt⁻; Noguchi et al., 1982) zur Verfügung.

Differenzierungsprozesse in Abhängigkeit von Q konnten nur in Mäusen untersucht werden, bei denen die Q-Defizienz durch eine keimfreie Haltung und Q-freie Ernährung über mehrere Monate induziert wurde (Katze und Beck, 1980; Reyniers et al., 1981).

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß *D. discoideum* als einfach zu handhabendes Modellsystem zur Untersuchung der funktionellen Rolle von Queuin und der Q-Familie der tRNAs verwendet werden kann.

Die tRNA-Queuin:Guanin-Transglycosylase des Schleimpilzes wurde in vitro nachgewiesen und charakterisiert.

Im erstellten Modellsystem - Q-frei und in Gegenwart von Queuin gezüchteter *D. discoideum* AX-2 - wurde der Einfluß von Q auf die Spiegel spezifischer tRNAs während des logarithmischen Wachstums untersucht. Es wird gezeigt, daß die zellulären Mengen der für Asp und Tyr spezifischen tRNAs abnehmen, wenn dem Medium kein Queuin zugesetzt wird, während die Spiegel von tRNA^{Asn} und tRNA^{His} unverändert bleiben. Eine Bestimmung der intrazellulären Stabilität dieser tRNAs ergab, daß (Q34)tRNA^{Asp} und (Q34)tRNA^{Tyr}, die ein hypermodifiziertes (wahrscheinlich glycosyliertes) Derivat von Q (Q*) besitzen, deutlich langsamer degradiert werden als die entsprechenden G-haltigen tRNAs, während die Stabilität von tRNA^{Asn} und tRNA^{His} unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Queuin ist.

B.1. MATERIAL UND METHODEN

B.1.1. Material und Geräte

Tabelle B.1.1 ist eine Aufstellung der Bezugsquellen wichtiger Chemikalien und Hilfsmittel. Substanzen, die bereits im ersten Teil der Arbeit verwendet wurden, sind hier nicht nochmals aufgeführt (s. Tab. A.1.1). Mit Ausnahme von ^3H -Asparagin (New England Nuclear Corp., USA) stammten alle radioaktiven Verbindungen vom Radiochemical Centre, Amersham (GB). Queuin wurde von Dr. Akimoto und Dr. Nomura (Central Research Laboratories, Takada Chemical Ind. Ltd., Osaka) chemisch synthetisiert und uns von Dr. Nishimura zur Verfügung gestellt.

In Ergänzung zu Tabelle A.1.3 enthält Tabelle B.1.2 weitere benutzte Arbeitsgeräte.

Tab. B.1.1: Bezugsquellen wichtiger Chemikalien und Hilfsmittel

Züchtung von D. discoideum

Oxoid, Wesel	Pepton, Hefeextrakt
Bayer AG, Leverkusen	Actinomycin C (Geschenk)
Hoechst AG, Hoechst	Streptomycin (Geschenk)
E. Merck, Darmstadt	2-Morpholinoethansulfosäure (MES)

Säulenchromatographie

Pharmacia, Uppsala, Schweden	Sephadex G-25 und G-150
Whatman, Maidstone, England	DEAE-Cellulose Typ DE-52
Ugine Kuhlmann, Frankreich	Résines Voltalef 300 LD-PL micro
Ashland Chemical Co., Ohio, USA	Adogen 464

Dünnschichtchromatographie

E. Merck, Darmstadt	Cellulose-Fertigplatten (Glas, 20x20cm) o. Fluoreszenzindikator
Sankyo Co. Ltd, Tokyo	Ribonuclease T_2 500 U/ml

Tab. B.1.2: Liste verwendeter Arbeitsgeräte

Züchtung von D. discoideum

Brunswick Scientific Co., USA	Rotationsschüttelmaschinen
Hettich, Tuttlingen	Zentrifuge Roto Silenta KS

Säulenchromatographie

LKB, Bromma, Schweden	Photometer Uvicord S
	Gradientenmischer 11 300 Ultragrad
	Fraktionensammler Ultrorac
	Peristaltische Pumpen
Millipore Corp., Bedford, USA	Absauganlage 1225 (radioakt. Proben)
	Filtrationsgerät XX 104720 (Puffer)
Bio-Rad, Richmond, USA	Chromatographiesäulen
Laborcenter, Erlangen	Chromatographiesäulen

Diverse

Kontron, Zürich, Schweiz	Ultrazentrifuge TGA 65
Shimadzu, Kyoto, Japan	Spektralphotometer UV-210A

B.1.2. Züchtung von Dictyostelium discoideum

Phosphatpuffer pH 6,0

KH_2PO_4 14,7 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 2,0 mM

Dictyostelium discoideum AX-2 ist eine vom Wildtyp NC-4 abgeleitete Mutante, die die Fähigkeit besitzt axenisch zu wachsen, d.h. sie kann Nährstoffe, die der Wildtyp nur durch Phagozytose von Bakterien aufnehmen kann, auch durch Pinocytose aus partikelfreiem Medium beziehen (Loomis, 1982).

Beide Stämme wurden bei 22°C in Brunswick-Rotationsschüttlern gezüchtet (180 Upm; Füllvolumen der Kolben: 20-30%). Ihr Wachstum wurde durch Auszählen der Zelldichte in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer verfolgt. Bei einer Dichte von $3-4 \times 10^6$ Zellen/ml wurde durch 3 min Zentrifugation mit 850 g bei 4°C geerntet.

B.1.2.1. D. discoideum AX-2

Der Stamm AX-2 wurde entweder im konventionellen, von Watts und Ashworth (1970; Pistel, 1982) beschriebenen Medium gezüchtet - im folgenden als "peptonhaltiges Medium" bezeichnet - oder in einem synthetischen Medium (Rahmsdorf, 1977), das mit Hefeextrakt supplementiert wurde (Ott et al., 1982a).

Die Zusammensetzung dieses "peptonfreien Mediums" ist der Tabelle B.1.3 zu entnehmen: Die unter (a) aufgeführten Stammlösungen werden autoklaviert (30 min, 121°C) bzw. sterilfiltriert und in der angegebenen Reihenfolge vereinigt. Das fehlende Volumen wird mit sterilem destilliertem Wasser ergänzt. Wegen der sehr niedrigen Lösungsgeschwindigkeit von Tyrosin empfiehlt es sich, die Mischung 10 Minuten lang in einem Bransonic-32-Bad zu beschallen. Nach dem Einstellen des pH-Wertes auf pH 6,8 mit 10%iger NaOH wird das Medium in vorsterilisierte Erlenmeyerkolben sterilfiltriert (Porengröße 0,22µm). Die autoklavierte Lösung des Hefeextraktes (Tab. B.1.3b) wird erst unmittelbar vor Gebrauch zum Medium gegeben.

Im peptonhaltigen Medium gewachsene Zellen werden wie folgt an die neuen Wachstumsbedingungen adaptiert: Aus den "Vorkulturen" ($4-5 \times 10^6$ Zellen/ml) wird in 20 ml peptonfreies Medium so überimpft, daß sich eine Ausgangszelldichte von 5×10^4 Zellen/ml ergibt. Diese "Adaptationskulturen" (Generationszeit ca. 9 Stunden) läßt man bis $3,5 \times 10^6$ Zellen/ml wachsen, bevor man ein zweites Mal in peptonfreies Medium überimpft (5×10^4 Zellen/ml). In diesen "Hauptkulturen" hat der Stamm AX-2 eine Generationszeit von 6,5 Stunden.

Wenn den Hauptkulturen synthetisches Queuin zugesetzt werden sollte, wurde eine sterilfiltrierte 10^{-4} - 10^{-3} M Lösung dieser Base in Phosphatpuffer pH 6,0 hergestellt und deren Gehalt photometrisch bestimmt; die Extinktion einer 10^{-5} M Lösung beträgt 0,105 (pH 7, Katze et al., 1982).

Tab. B.1.3: Zusammensetzung des peptonfreien Mediums

Bestandteil	Konzentration im Medium	Stammlösung (in Aq. bidest.)
<u>a) Synthetisches Medium (Rahmsdorf, 1977)</u>		
KH_2PO_4	0,68 g/l (5,0 mM)	10 x
* $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,89 g/l (5,0 mM)	10 x
NH_4Cl	0,40 g/l (7,5 mM)	50 x
Glucose	19,8 g/l (100 mM)	10 x
Aminosäurelösungen je	0,50 g/l	10 x
1: Ala/Arg/Asn/Asp/Cys		
2: Gln/Glu/Gly/His/Ile		
3: Leu/Lys/Met/Phe/Pro		
4: Ser/Thr/Trp/Tyr/Val		
*Vitaminlösung		10 x
für 1 l Medium:		
Biotin 0,25 mg; Pantothersäure 7,5 mg;		
Folsäure 1,25 mg; Pyridoxin·HCl 1,25 mg;		
Niacinamid 7,5 mg; Thiamin·HCl 12,5 mg;		
Inositol 2,5 mg; Cholinchlorid 7,5 mg;		
Riboflavin 2,0 mg; DL- α -Liponsäure 2,0 mg;		
Cyanocobalamin 2,0 mg		
EDTA	48,4 mg/l (0,13 mM)	200 x
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	98,6 mg/l (0,40 mM)	200 x
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	21,9 mg/l (0,076 mM)	200 x
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	4,9 mg/l (0,025 mM)	200 x
H_3BO_3	11,1 mg/l (0,18 mM)	200 x
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	5,0 mg/l (0,018 mM)	200 x
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	1,6 mg/l (0,0067 mM)	200 x
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	1,6 mg/l (0,0064 mM)	200 x
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	1,0 mg/l (0,0008 mM)	200 x
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	73,5 mg/l (0,50 mM)	200 x
<u>b) Hefeextrakt-Lösung</u>		
Hefeextrakt	7,15 g/l	20 x

Vor dem Autoklavieren werden die Aminosäurelösungen auf pH 6,8 eingestellt und die Lösungen von ZnSO_4 , FeSO_4 , CoCl_2 und CuSO_4 mit HCl angesäuert.

Die mit (*) gekennzeichneten Lösungen werden durch Sterilfiltration entkeimt. Die Vitaminlösung wird portioniert bei -20°C gelagert.

B.1.2.2. D. discoideum NC-4

Der Wildtypstamm NC-4 wurde wie bei Sussman (1976) beschrieben auf Bakterien gezüchtet:

Zellen aus stationären Kulturen von E. coli B/r (Medium: Lab-Lemco-Powder, Pepton, NaCl je 5,0 g/l; pH 7,0) wurden hierzu durch Zentrifugation geerntet, mit Phosphatpuffer pH 6,0 gewaschen und anschließend im selben Puffer zu einer Dichte von $A_{578}=10$ resuspendiert. Nach dem Abportionieren in sterile Erlenmeyerkolben wurden die Bakteriensuspensionen höchstens drei Tage unter Schütteln im Kühlraum aufbewahrt.

D. discoideum NC-4 wächst in diesem Medium mit einer Generationszeit von 3 Stunden. Bei einer Dichte von 7×10^6 Zellen/ml wurden die Amöben geerntet und durch zweimaliges Waschen mit Phosphatpuffer pH 6,0 weitgehend von Bakterien befreit. Die Zentrifugationen erfolgten jeweils bei 750 g, 4°C (5 min).

B.1.3. Markierung der Zellen mit ^{32}P -Orthophosphat

Phosphatpuffer pH 6,8



Zur Markierung von D. discoideum AX-2 mit ^{32}P -Orthophosphat wurde ein phosphatarmes peptonfreies Medium verwendet, das statt mit KH_2PO_4 und Na_2HPO_4 (je 5mM), mit 2-Morpholinoethansulfonat (10 mM, pH 6,8) gepuffert war. Der Zusatz des trägerfreien Orthophosphates (2,5 mCi / 20 ml Kultur) erfolgte bei einer Dichte von $7,5 \times 10^5$ Zellen/ml. Bei 3×10^6 Zellen/ml wurde der Einbau durch Zugabe von Phosphatpuffer pH 6,8 (Endkonz. 10 mM PO_4^{3-}) gestoppt. Die Zellen wurden anschließend geerntet, zweimal mit TMS-Puffer (B.1.5.) gewaschen und mit dem vierfachen Feuchtgewicht an unmarkierten Carrier-Zellen (aus peptonhaltigem Medium) versetzt.

B.1.4. Hemmung der zellulären RNA-Synthese

Um die Degradation einzelner tRNAs in *D. discoideum* zu messen, wurde die Neusynthese von RNA in logarithmisch wachsenden Zellen durch Zugabe von 100 µg/ml Actinomycin C gehemmt: Die frisch bereitete Lösung des Antibiotikums (2,5 mg/ml in sterilem Aq. bidest.) wurde den Kulturen bei einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml (peptonhaltiges Medium) bzw. $3,5 \times 10^6$ Zellen/ml (peptonfreies Medium) zugesetzt.

B.1.5. Präparation und Reinigung von tRNA

TMS / TMS-0,2 / TMS-1,0

Tris·HCl 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $Na_2S_2O_3$ 2mM, NaCl 0/0,2/1,0 M; pH 7,5

Sephadex-G-150-Puffer

Tris·HCl 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM, NaN_3 0,04% (w/v), NaCl 0,2 M; pH 7,5

Die Präparation von tRNA aus *D. discoideum* folgte im wesentlichen der Vorschrift von Palatnik et al. (1977) mit den bei Pistel (1982) beschriebenen Modifikationen: Die nach dem Phenolaufschluß von 0,15 bis 15 g Zellen erhaltenen wäßrigen Phasen wurden ohne vorherige Fällung mit Ethanol direkt auf eine DE-52-Säule aufgezogen (Bettvolumen: $\geq 1/2$ des Zellfeuchtgewichtes). Nach Vorwaschen mit TMS und TMS-0,2 wurde die tRNA mit TMS-1,0 eluiert. Die tRNA-haltigen Fraktionen wurden anschließend über Sephadex G-25 (medium, 1,4 x 65 cm, Fluß 60 ml/h) oder, bei geringen Mengen, durch zweimaliges Füllen mit Ethanol / 2% KAc entsalzt.

Verunreinigungen dieser Präparationen mit höhermolekularen Nucleinsäuren wurden in einigen Versuchen noch durch Gelfiltration an einer Sephadex-G-150-Säule entfernt (1,6 x 85 cm, 4°C, Fluß 10,4 ml/h).

B.1.6. Präparation eines tRNA-freien S-100 aus *D. discoideum* AX-2

Synthetasepuffer

Tris·HCl 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM, β -ME 14 mM,

Glycerin 10% (w/v); pH 7,5

Ausgangsmaterial für die Enzympräparation waren logarithmisch (3×10^6 Zellen/ml) im peptonfreien Medium wachsende Zellen des Stammes AX-2,

die durch Zentrifugation geerntet und mit Synthetasepuffer gewaschen wurden. 4 g Zellen wurden in Synthetasepuffer zu 9 ml resuspendiert. Jeweils 3 ml dieser Suspension wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mikrodismembrator II 3 Minuten aufgeschlossen (15ml-Kapsel, Wolframcarbidkugel 8 g, Raumtemperatur -15°C). Nach dem Verdünnen des Extraktes mit 12 ml Synthetasepuffer erfolgte die Aufreinigung durch Zentrifugation, DEAE-Chromatographie, Ammonsulfatfällung und Dialysieren wie bei Palatnik et al. (1977; Pistel, 1982) beschrieben.

B.1.7. Aminoacylierung von tRNA und RPC-5-Chromatographie

Die für die verwendete Enzympräparation optimierten Reaktionsbedingungen zur Aminoacylierung von tRNAs waren ähnlich den von Palatnik et al. (1977) gefundenen: 35µl-Ansätze enthielten 0,3 bis 0,5 A₂₆₀ tRNA, 100mM Natriumcacodylat pH 7,5 und die Tabelle B.1.4 angegebenen Konzentrationen an ATP, Mg²⁺, Spermidin, radioaktiver Aminosäure und Enzymextrakt. Zur Aminoacylierung mit Asparagin wurde den Ansätzen noch 20µM unmarkierte Asparaginsäure zugesetzt, da im S-100-Extrakt von *D. discoideum* hohe Asparaginaseaktivitäten nachweisbar waren (B.2.3.1.). Die Inkubation erfolgte bei 22°C.

Analytische Aminoacylierung: Die mit 10%iger TCA fällbare Radioaktivität wurde in Entnahmen von jeweils 5µl bestimmt (vgl. A.1.4.1.).

Präparative Aminoacylierung: Nach Erreichen des Aminoacylierungsplateaus wurden die Ansätze umgepuffert (HAc/NaAc-Puffer 1M, pH 4,5, Endkonzentration 100mM) und die tRNAs durch Phenolisieren und anschließende Ethanolpräzipitation der wäßrigen Phase gereinigt.

Die Trennung von tRNA-Isoakzeptoren durch RPC-5-Chromatographie und die Perjodat-Oxidation Q-haltiger tRNAs wurden wie bei Pistel (1982) beschrieben durchgeführt.

Tab. B.1.4: Reaktionsbedingungen für die Aminoacylierung von tRNAs

Aminosäure	ATP (mM)	MgCl ₂ (mM) ²	Spermidin (mM)	Aminosäure (μM)	S-100-Enzym (μg/μl)
Asn	6	15	2	20	3
Asp	6	7	-	20	6
His	6	40	2	70	3
Phe	6	15	-	20	0,6
Ser	12	15	2	20	1,5
Tyr	6	15	2	20	3

B.1.8. tRNA-Transglycosylase-Reaktionen

Guanylierung von tRNA

Zur Analyse Q-defizienter tRNA aus *D. discoideum* wurde hochgereinigte *E. coli*-tRNA-Guanin-Transglycosylase ("Fraktion V" nach Okada und Nishimura, 1979), die uns von Dr. Nishimura zur Verfügung gestellt wurde, verwendet (Reaktionsbedingungen: Pistel, 1982). Für die Präparation von spezifisch an Position 34 mit ³H-Guanin markierter tRNA wurde eine in unserem Arbeitskreis von Dr. Aschhoff und I. Benz angereicherte Enzymfraktion ("Fraktion III") eingesetzt. Der 400μl-Reaktionsansatz zur Guanylierung von 2 A₂₆₀ Q-freier tRNA aus *D. discoideum* (gereinigt über Sephadex G-150) enthielt: 70mM Tris·HCl (pH 7,5), 18mM MgCl₂ und 85μg Enzym "Fraktion III". Nach 30 Minuten Vorinkubation (37°C) wurde die Reaktion durch Zugabe von ³H-Guaninsulfat (Endkonzentration 8,6μM) gestartet und 2 Stunden später durch Phenolisieren der Ansätze gestoppt. Die tRNA wurde schließlich nach Fällung mit Ethanol/2%KAc durch DEAE-Chromatographie gereinigt und über Sephadex G-25 entsalzt (s. B.1.5.).

Insertion von Queuin in tRNAs

Gepufferte Natronlauge

NaOH 0,6 M, KH₂PO₄ 0,25 M, Na₂HPO₄ x 2H₂O 0,25 M
(Die Molarität der NaOH wird durch Titration der verwendeten TCA eingestellt)

Die Insertion von Queuin wurde indirekt über die Freisetzung von ^3H -Guanin aus spezifisch an Position 34 markierter tRNA (s.o.) bestimmt. 35 μl -Standardansätze wurden bei 22°C inkubiert:

^3H -G34-tRNA (D. discoideum)	0,1 A ₂₆₀
Natriumcacodylat pH 7,5	100 mM
MgCl ₂	15 mM
Spermidin	2 mM
Queuin	0,01-10 μM
tRNA-freier S-100-Extrakt aus D. discoideum	3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten wurden Proben von 8 μl entnommen und 15 min bei 0°C mit 300 μl 0,6M TCA (=10%) gefällt. Nach dem Abzentrifugieren (Tischzentrifuge, 5 min, 4°C) wurden 257 μl des Überstandes mit 250 μl gepufferter Natronlauge neutralisiert und mit 5 ml Toluol-Triton-Szintillator versetzt. Sobald die ausfallenden Salze sedimentiert sind (etwa 2 Stunden), beträgt die Zählausbeute 24%.

Die Ergebnisse wurden bezogen auf die Gesamtmenge des in der tRNA enthaltenen ^3H -Guanins, die durch Hydrolyse mit 0,6M TCA (15 min, 90°C) ermittelt wurde.

B.1.9. 2-Dimensionale Gelelektrophorese von tRNA

B.1.9.1. Elektrophoretische Trennung

Pufferlösung A

Tris $\cdot\text{H}_3\text{BO}_3$ 0,08 M, Harnstoff 4 M, EDTA 0,001 M; pH 8,3

Die zweidimensionale Trennung von tRNAs in Polyacrylamid(PAA)-Harnstoff-Gelen wurde, wie bei Fradin et al. (1975) beschrieben, mit 10%-PAA-Gelen in der ersten und 20%-PAA-Gelen in der zweiten Dimension durchgeführt. Die Arbeitsvorschrift, sowie alle benötigten Lösungen finden sich bei Th. Dingermann (1980).

Da selbst mit den von Th. Dingermann vorgenommenen Modifikationen der Originalmethode die erste Dimension nur unbefriedigend auf die zweite aufpolymerisierte, mußte dieser Teil der Vorschrift nochmals abgeändert werden.

Die Gelgröße der zweiten Dimension wurde auf 170 x 130 x 2 mm (HxBxD) reduziert, so daß die Platten und Kammern der 2D-Proteingele verwendet werden konnten. Alle Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt:

Die Platten wurden unten mit einem 20%-PAA-Gel abgedichtet (entgast, Starter: TMED und $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ je 0,1% (w/v)). Sobald der Gelfuß polymerisiert war, wurde das 20%ige Trenngel bis 3 cm unter die Oberkante der Platten gegossen. Das 10%ige Sammelgel bestand aus zwei Schichten: Die erste Schicht (3 ml = 1,1 cm) wurde nach dem Polymerisieren des Trenngels (ca. 3 h) aufgebracht, die zweite (bis Plattenoberkante) erst zwei Stunden später, unmittelbar vor dem Auflegen der ersten Dimension. Die 1,5 mm starken Streifen der ersten Dimension wurden vor dem Einpolymerisieren in dieses Gel 5-20 min in die obenstehende Pufferlösung A eingelegt.

Nachdem die Gele über Nacht bei 4°C gelagert worden waren, erfolgte die Elektrophorese mit einer konstanten Spannung von 180 V über 4 Tage bei 4°C.

B.1.9.2. Detektion und Quantifizierung der tRNAs

Zur Detektion von nicht radioaktiv markierten tRNAs ($2 \text{ A}_{260}/\text{Gel}$) wurden die Gele auf eine DC-Platte gelegt, die mit einem bei 254 nm anregbaren Fluoreszenzindikator imprägniert war. Die einzelnen Flecken sind beim Bestrahlen mit einer UV-Lampe als Fluoreszenzlöschung sichtbar (Hassur und Whitlock, 1974).

Gele mit ^{32}P -markierten tRNAs ($0,5\text{-}1 \text{ A}_{260}$, $1\text{-}3 \times 10^6$ cpm) wurden nach Abnahme der oberen Glasplatte mit Haushaltsfolie abgedeckt und auf Kodak NS-2T Roentgenfilm 10 bis 60 Minuten exponiert. Um die relativen tRNA-Mengen in den radioaktiven Gelen zu ermitteln, wurden dann alle deutlich sichtbaren Flecken mit einem Korkbohrer ($\varnothing$ 7mm) ausgestochen und der Gehalt an ^{32}P nach der Cerenkov-Methode bestimmt: Die Gelscheiben wurden dazu in Eppendorf-Caps in Packardgläser gegeben und ohne Zugabe eines Szintillators wie eine Tritiummarkierung gezählt. Zur Kontrolle der Präzision und Vollständigkeit des Ausstechens, wurden die Gele im Anschluß daran nochmals für eine längere Zeitspanne auf Roentgenfilm exponiert.

B.1.9.3. Extraktion und Analyse der tRNAs

Elutionspuffer

NaAc/HAc 100 mM, $MgCl_2$ 10 mM, NaCl 300 mM; pH 4,5

Für die Extraktion der tRNAs wurden die ausgestochenen Gelscheiben mehrfach in flüssigem Stickstoff eingefroren (Eppendorf-Caps) und mit einem PVC-Stab fein gemahlen. Nach der Zugabe von 200 μ l Elutionspuffer und 200 μ l mit Elutionspuffer gesättigtem Phenol wurde 3 Stunden kräftig geschüttelt (IKA-Vibrax-VXR-Schüttler). Die Mischung wurde zentrifugiert (Tischzentrifuge, 5 min, 20°C), die wäßrige Phase abgehoben und die Phenolphase nochmals 1 Stunde mit 200 μ l Elutionspuffer gewaschen. Zu den vereinigten wäßrigen Phasen wurden 0,5 A_{260} Carrier-RNA gegeben: 16+23S rRNA aus *E. coli*, wenn die extrahierten Nucleinsäuren anschließend aminoacyliert werden sollten - andernfalls tRNA aus *D. discoideum*. Zum Schluß wurde die tRNA durch zweimalige Fällung mit 2,5 Volumenteilen Ethanol/2%KAc gereinigt und wieder in 100 μ l Wasser gelöst ("Eluat").

Gele mit unmarkierter tRNA (2 A_{260}) aus *D. discoideum* dienen zur Identifizierung der in den einzelnen Flecken enthaltenen tRNAs. Hierzu wurde jeweils 1/5 bis 1/4 des Gesamteluates zur Trockene gebracht und in einem 10 μ l-Ansatz aminoacyliert (Reaktionsbedingungen: B.1.7., Zeit: 30-40 min). Um die Leerwerte niedrig zu halten wurden folgende Maßnahmen getroffen:

- (1) Die Konzentration der 3H -Aminosäure wurde auf 10 μ M reduziert.
- (2) Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 10 μ l 0,2M NaAc/HAc-Puffer, pH 4,5, der 0,8M an der betreffenden Aminosäure war (Endkonzentration: 0,1M Ac^- , 0,4M Aminosäure). Erst dann wurden 16 μ l entnommen, auf Filterplättchen pipettiert und
- (3) in 10%ige TCA geworfen, die ebenfalls die betreffende Aminosäure enthielt (0,8mM).

Die Bestimmung der fällbaren Radioaktivität erfolgte wie in A.1.4.1. beschrieben.

Eluate aus Gelen mit ^{32}P -markierten tRNAs wurden zur weiteren Auftrennung der RNAs durch RPC-5-Chromatographie (B.1.7.) oder zur Nucleotidanalyse nach Nishimura (Kasai et al., 1975a; Dingermann, 1980) verwendet.

B.2. ERGEBNISSE

B.2.1. D. discoideum: Ein Modellsystem zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von Queuin und der Q-Familie der tRNAs

Verglichen mit der großen Zahl von Arbeiten, die Veränderungen des Queuosin(Q)-Gehaltes in den tRNAs während der Differenzierung und des Alterns von Geweben beschreiben (Übersicht: Nishimura, 1983), nehmen sich die wenigen Studien zur funktionellen Bedeutung dieses Nucleosids in vivo recht bescheiden aus: Phänomene, die Differenzierungsvorgänge betreffen, konnten nicht in LM-Zellkulturen (Katze, 1978) oder in den kürzlich von Noguchi et al. (1982) konstruierten E. coli-Mutanten, denen die tRNA-Guanin-Transglycosylase fehlt (tgt^-), untersucht werden. Das einzige Modellsystem, das bisher zur Verfügung stand, waren Q-frei gezüchtete Mäuse: Katze und Beck (1980) und Reyniers et al. (1981) hatten gefunden, daß diese Tiere Queuin nicht selbst synthetisieren, sondern es mit der Nahrung oder von ihrer Darmflora aufnehmen. Größere Untersuchungen wurden jedoch durch die erforderliche aufwendige keimfreie Haltung der Mäuse behindert.

D. discoideum AX-2 besitzt, wenn er im konventionellen, peptonhaltigen Medium gewachsen ist, sowohl Q- als auch unmodifizierte, G-haltige tRNA-Isoakzeptoren (Dingermann et al., 1981; Pistel, 1982). Da dieser Schleimpilz als sehr einfach zu handhabendes (und schnelles) Modellsystem für Differenzierungsvorgänge etabliert ist, wurde im folgenden untersucht, ob auch er, wie die oben angeführten Mäuse und wahrscheinlich eine ganze Reihe weiterer Organismen (Katze et al., 1982), nicht in der Lage ist, Queuin selbst zu synthetisieren. Wenn dies der Fall wäre, könnten durch Züchtung in einem Q-freien Medium Zellen erhalten werden, deren tRNAs bezüglich Q völlig unmodifiziert sind. Durch Zugabe von synthetischem Queuin zum Medium, sollte es im weiteren dann möglich sein, den Q-Gehalt der tRNAs wenigstens teilweise wieder zu rekonstituieren.

B.2.1.1. Züchtung von *D. discoideum* AX-2 in einem Q-freien Medium

Um die Frage zu beantworten, ob *D. discoideum* AX-2 Queuin selbst synthetisieren kann, oder ob er auf die exogene Zufuhr dieser Base angewiesen ist, mußte zunächst ein Q-freies Medium entwickelt werden, das ausreichende Wachstumsraten ermöglichte.

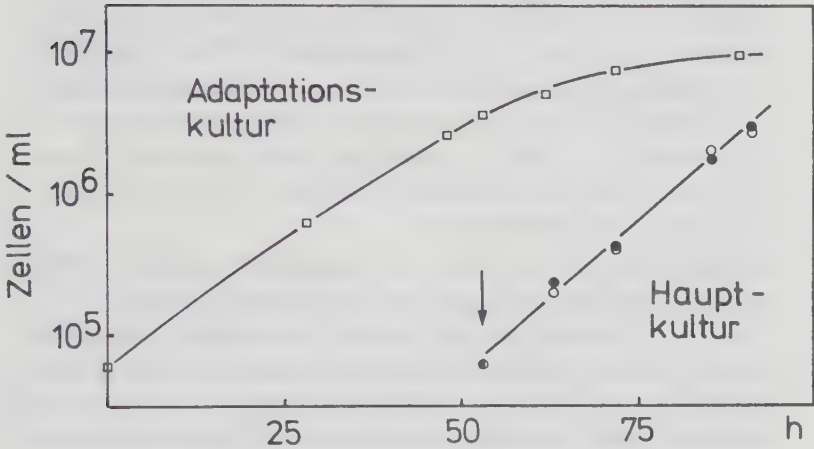
Erste Versuche mit einem vollsynthetischen Medium nach Rahmsdorf (1977) zeigten, daß unser Laborstamm AX-2 in diesem Medium weit schlechter wuchs, als der in dieser Arbeit verwendete Stamm AX-2: In 20ml-Kulturen betrug die Generationszeit 28 statt der beschriebenen 16-20 Stunden; die stationäre Phase wurde bereits bei 2×10^6 Zellen/ml erreicht. Eine Adaptation an das Medium erfolgte auch nicht nach mehreren Passagen - im Gegenteil, die Generationszeit stieg langsam auf 40 Stunden⁺.

Da es nicht gelang, das Wachstum durch Zugabe verschiedener definierter Komponenten zum Medium zu beschleunigen, wurde schließlich Hefeextrakt in einer Konzentration, wie sie im konventionellen "peptonhaltigen" Medium vorliegt (7,15 g/l), zugesetzt. Dieser sollte im Gegensatz zum Pepton (aus Fleisch) frei von Q sein, da Hefen als bisher einzige bekannte Eukaryonten keine Q-haltigen tRNAs besitzen. Die Zugabe des Hefeextraktes steigerte die Wachstumsrate extrem: Nach einer "Adaptationspassage" in diesem, im weiteren als "peptonfrei" bezeichneten Medium, betrug die Generationszeit in der folgenden Passage nur noch 6,5 Stunden. *D. discoideum* wächst somit unter diesen Bedingungen schneller als im konventionellen, "peptonhaltigen" Medium (8 h).

Ein Zusatz von synthetischem Queuin (10^{-7} bis 10^{-5} M) zum peptonfreien Medium hatte keinen Einfluß auf die Wachstumsrate des Stammes.

⁺) Unterschiede zwischen ursprünglich identischen Laborstämmen von *D. discoideum* wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Dr. Gerisch, persönliche Mitteilung).

Abb.2.1: Typische Wachstumskurven des Stammes *D. discoideum* AX-2 im peptonfreien Medium



Aus einer "Vorkultur" im konventionellen, peptonhaltigen Medium wurde bei $4-5 \times 10^6$ Zellen/ml so in peptonfreies Medium überimpft, daß sich eine Dichte von 5×10^4 Zellen/ml ergab:

-□- : "Adaptationskultur" - Generationszeit etwa 9 h

Bei $3,5 \times 10^6$ Zellen/ml wurde aus dieser Kultur in gleicher Weise wiederum in peptonfreies Medium überimpft:

-○- : "Hauptkultur" ohne Queuin-Zusatz - Generationszeit 6,5 h

-●- : "Hauptkultur" mit 10^{-7} M Queuin - Generationszeit 6,5 h

B.2.1.2. Das Auftreten von Q-haltigen tRNAs in *D. discoideum* in Abhängigkeit vom Medium

Wenn *D. discoideum* AX-2 im konventionellen, peptonhaltigen Medium gewachsen ist, werden zwei Hauptisoakzeptoren für tRNA^{Asn} gefunden (Palatnik et al., 1977). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß der bei der RPC-5-Chromatographie früher eluierende Isoakzeptor Q enthält, während der andere an Position 34 unmodifiziert ist (G34) (Dingermann et al., 1981). Diese beiden tRNAs dienen als Indikatoren für die An- bzw. Abwesenheit Q-haltiger tRNAs unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen.

In tRNA-Präparationen aus dem Wildtypstamm NC-4, der auf *E. coli* als Nahrungsquelle gewachsen war, fand sich nur ein Isoakzeptor für tRNA^{Asn}: Die Retentionszeit dieser tRNA bei der RPC-5-Chromatographie ist mit der des Q-haltigen Isoakzeptors aus dem Stamm AX-2 (Abb. B.2.2a) identisch. Auch nach einer Behandlung mit Perjodat (Wosnick und White, 1979), das Q an der cis-Diol-Gruppe spaltet und zur Ausbildung eines hydrophoben Pyrrolringes führt, eluieren die beiden tRNAs bei der gleichen - höheren - Salzkonzentration, während der Q-defiziente Isoakzeptor des Stammes AX-2 seine Position im RPC-5-Profil nicht verändert (Abb. B.2.2b).

Dieser Befund läßt vermuten, daß der Wildtypstamm NC-4 von den Bakterien, als seiner natürlichen Nahrungsquelle, ausreichend mit Q versorgt wird, während beim axenisch wachsenden Stamm AX-2 das - wahrscheinlich durch das Pepton ins Medium eingebrachte - Queuin limitierend ist. Wenn diese Überlegungen richtig sind, sollte in *D. discoideum* AX-2, wenn er im peptonfreien Medium gezüchtet wird, überhaupt kein Q-haltiger Isoakzeptor für tRNA^{Asn} mehr nachweisbar sein.

Um dies zu überprüfen, wurde tRNA aus logarithmisch im peptonfreien Medium wachsenden Zellen isoliert, mit Asparagin beladen und über RPC-5 aufgetrennt (Abb. B.2.3a): Das Elutionsprofil zeigte nur einen Isoakzeptor, der genau die gleiche Retentionszeit besitzt wie der Q-defiziente Isoakzeptor aus Zellen, die im peptonhaltigen Medium gezüchtet wurden. Er ist wie dieser unempfindlich gegen eine Perjodatbehandlung (nicht gezeigt).

Bereits ein Zusatz von nur 10^{-7} M Queuin zum peptonfreien Medium

hatte bei *D. discoideum* AX-2 eine praktisch vollständige Modifikation der tRNA^{Asn} zur Folge: Im RPC-Profil ist unter diesen Bedingungen kein Q-defizienter Isoakzeptor mehr nachweisbar; das chromatographische Verhalten der tRNA entspricht auch bei einer Behandlung mit Perjodat dem des Q-haltigen Isoakzeptors aus Zellen, die im peptonhaltigen Medium gewachsen sind (o. Abb.).

Analoge Ergebnisse wurden auch für tRNA^{Asp} und tRNA^{Tyr} erhalten; sie werden in Kapitel B.2.3. gezeigt.

Legende zu Abbildung B.2.2:

- a) Der Wildtyp NC-4 wurde auf *E. coli* B/r gezüchtet (—), der Stamm AX-2 im konventionellen peptonhaltigen Medium (---): Die aus diesen Stämmen isolierte Gesamt-tRNA wurde mit ³H-Asn aminoacyliert und über RPC-5 (pH 4,5) aufgetrennt. In jeder Fraktion wurde die mit TCA fällbare Menge an Radioaktivität bestimmt. Gezeigt sind die Elutionsprofile zweier aufeinanderfolgender Läufe.
- b) wie Abb. a) - hier wurden die tRNAs jedoch nach der Aminoacylierung mit ³H-Asn (und 18 unmarkierten Aminosäuren) mit Perjodat behandelt (Wosnick und White, 1979). Q-haltige tRNAs werden dadurch oxidiert und eluieren erst bei höherer Salzkonzentration, während das Elutionsverhalten von tRNAs mit G an Position 34 unverändert bleibt.

Legende zu Abbildung B.2.3:

- (—): Die tRNA wurde isoliert aus Zellen von AX-2, die im peptonfreien Medium ohne Zusatz von Queuin (a) bzw. unter Zusatz von 10⁻⁷ M Queuin (b) gewachsen waren.
- (---): Zum Vergleich ist jeweils noch das RPC-Profil von Asparaginyl-tRNA aus Zellen, die im konventionellen, peptonhaltigen Medium gezüchtet wurden, mit eingezeichnet.

Einzelheiten siehe Legende zu Abb. B.2.2.

Abb. B.2.2: RPC-5-Profile von Asparaginy1-tRNA aus dem Wildtypstamm NC-4 und dem axenisch wachsenden Stamm AX-2

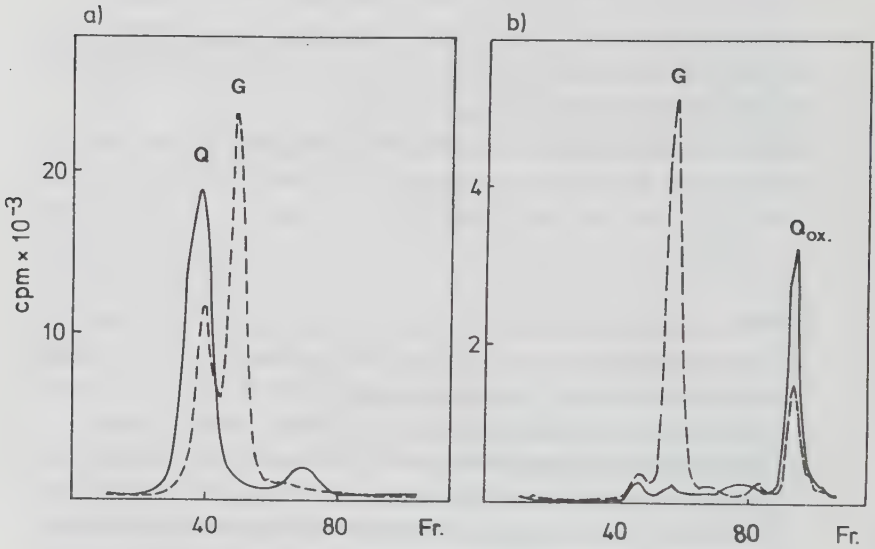
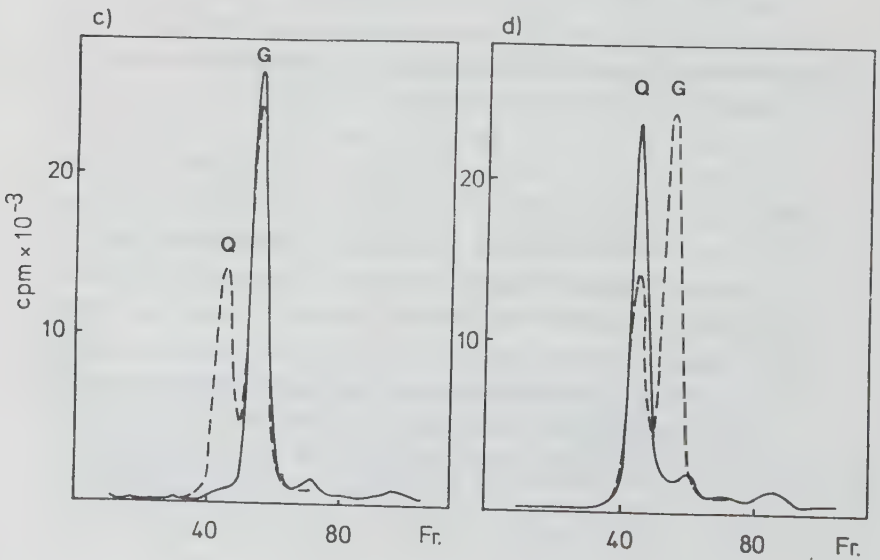


Abb. B.2.3: RPC-5-Profile von Asparaginy1-tRNA aus *D. discoideum* AX-2 im peptonfreien Medium



B.2.1.3. Quantitative Bestimmung der Q-defizienten tRNAs in D. discoideum in Abhängigkeit vom Medium

Im vorigen Abschnitt wurde das Auftreten Q-haltiger tRNAs durch Perjodatbehandlung und RPC-5-Chromatographie untersucht. Als Gegenprobe zu diesen Versuchen wurde enzymatisch auch die Menge der Q-defizienten, G34-haltigen tRNAs unter den gegebenen Wachstumsbedingungen ermittelt: Das Enzym E. coli-tRNA-Guanin-Transglycosylase katalysiert spezifisch den Austausch von Guanin an Position 34 der tRNAs der Q-Familie gegen freies Guanin oder gegen Vorstufen von Queuin. Q-haltige tRNA ist kein Substrat für dieses Enzym. Bietet man zum Austausch mit Tritium markiertes Guanin an, so entspricht die Menge an Radioaktivität, die in die tRNA eingebaut wird, der Menge an Q-defizienter tRNA (Okada et al., 1978).

Verunreinigungen der tRNA-Präparationen mit höhermolekularen Nucleinsäuren wurden vor diesen Versuchen durch Gelchromatographie an Sephadex G-150 entfernt. Der Guanineinbau, der gefunden wurde, wenn die tRNA aus Zellen isoliert wurde, die im peptonfreien Medium ohne Zusatz von Queuin gewachsen waren, wurde als 100% gesetzt (Tab.

B.2.1; erste Reihe):

Beim Stamm AX-2 verringert sich der Anteil der Q-defizienten tRNAs, wenn er im peptonhaltigen Medium gezüchtet wird, auf etwa 70%. Die gute Übereinstimmung dieses Ergebnisses mit dem aus dem RPC-5-Profil der AsparaginyI-tRNA ableitbaren Wert zeigt, daß tRNA^{Asn} ein geeigneter Indikator für die An- bzw. Abwesenheit von Q in den tRNAs der Q-Familie ist.

Der Wildtypstamm NC-4 enthält, wenn er auf Bakterien - also auf seiner natürlichen Nahrungsquelle - gewachsen ist, weniger als 8% Q-defiziente tRNAs.

Noch geringer ist der Anteil dieser tRNAs schließlich in Zellen, bei denen synthetisches Queuin zum peptonfreien Medium gegeben wurde - hier wurden nur noch weniger als 2,5 bzw. 2% unmodifizierte tRNAs gefunden.

Da aus diesem Ergebnis geschlossen werden kann, daß alle tRNA-Isoakzeptoren praktisch quantitativ in Q-haltige tRNAs überführt wurden, steht uns mit D. discoideum AX-2 ein System zur Verfügung, in dem die

funktionelle Rolle von Q untersucht werden kann: Q-freie, d.h. im peptonfreien Medium gewachsene Zellen können verglichen werden, mit Zellen, deren tRNAs durch den Zusatz von 10^{-7} M Queuin zum Medium praktisch vollständig bezüglich dieser Base modifiziert sind.

Tab. B.2.1: Relative Mengen der Q-defizienten tRNAs in *D. discoideum* AX-2 in Abhängigkeit vom Medium

Stamm und Medium	Relativer Anteil (%) der Q-defizienten tRNA bestimmt über			
	Einbau von ³ H-Guanin in Gesamt-tRNA durch die E. coli-tRNA-Guanin- Transglycosylase nach:			RPC-5-Profile von AsparaginyI-tRNA
	1 h	2 h	4 h	
AX-2: peptonfreies Medium ohne Queuinzusatz	100	100	100	100
AX-2: konventionelles pep- tonhaltiges Medium	67	71	68	63
NC-4: E. coli B/r	10,1	8,8	7,6	Spuren ⁺
AX-2: peptonfreies Medium + 0,1 µM Queuin	2,0	2,2	2,3	0
AX-2: peptonfreies Medium + 10 µM Queuin	1,6	1,6	1,8	0

Transglycosylase-Reaktion: Die 100 μl -Ansätze enthielten jeweils 0,5 A₂₆₀ tRNA und 2 U hochgereinigte *E. coli*-tRNA-Guanin-Transglycosylase (Okada et al., 1978). Angegeben sind die Mittelwerte zweier Bestimmungen. Bei tRNA aus Zellen, die im peptonfreien Medium ohne Zusatz von Queuin gewachsen sind, wurden $1,6 \times 10^4$ cpm / 15 μl Entnahme nach 1 h Inkubation gefunden. Die Leerwerte (ohne tRNA) betrugen 230 cpm.

⁺) Spuren Q-defizienter tRNA waren nach der Perjodatbehandlung sichtbar. Dies war nicht der Fall bei den tRNAs, die aus unter Zusatz von Queuin gezüchteten AX-2-Kulturen isoliert wurden.

B.2.2. Die tRNA-Queuin:Guanin-Transglycosylase aus *D. discoideum* in vitro

Wie im letzten Abschnitt gezeigt, führt ein Zusatz von nur 10^{-7} M Queuin zum peptonfreien Medium bereits zu einer fast vollständigen Modifikation der tRNAs der Q-Familie in *D. discoideum* AX-2.

In den bisher untersuchten Pro- und Eukaryonten werden die tRNAs der Q-Familie durch einen Austausch des Guanins an Position 34 gegen Queuin oder gegen dessen Vorstufen modifiziert (Transglycosylase-Reaktion). Alle bisher bekannten tRNA-(Queuin:)Guanin-Transglycosylasen (*E. coli*, Säuger, *Drosophila*, Weizenkeimlinge) katalysieren auch den Austausch des Guanin 34 gegen Guanin (statt Queuin). Versuche von F. Pistel, eine solche tRNA-Transglycosylase in Extrakten von *D. discoideum* mit ^3H -Guanin als Substrat nachzuweisen, verliefen jedoch negativ. Da uns nunmehr Queuin selbst zur Verfügung stand, konnte untersucht werden, ob die Transglycosylase aus *D. discoideum* eine einzigartig hohe Spezifität für Queuin besitzt, die diese Ergebnisse erklären könnte.

Die im Zuge dieser Versuche erstellte Methode zur Messung des Einbaus von Queuin in tRNAs bot sich außer zur Untersuchung der Eigenschaften des Enzyms, wegen der tatsächlich gefundenen Spezifität, auch zur Routinebestimmung von freiem Queuin an: In TCA-Extrakten verschiedener Gewebe wurde der Gehalt dieser modifizierten Base nach einer Anreicherung durch Affinitätschromatographie bestimmt (Zubrod et al., 1983). Die gefundenen Konzentrationen lagen deutlich über der Erfassungsgrenze der Methode, und die in Vergleichsmaterialien ermittelten Mengen stimmten gut mit den massenspektrometrischen Werten von Katze et al. (1982) überein.

B.2.2.1. Nachweis der tRNA-Transglycosylase in S-100-Extrakten aus
D. discoideum AX-2

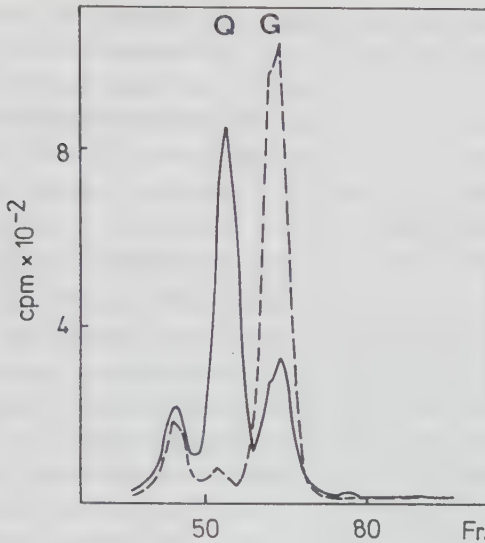
Frühere Versuche hatten gezeigt, daß in Extrakten aus D. discoideum keine Enzymaktivität nachweisbar ist, die ^3H -Guanin in Q-defiziente tRNAs inkorporiert. Dieses Ergebnis bestätigte sich auch für den in den folgenden Versuchen verwendeten tRNA-freien S-100-Extrakt aus Zellen des Stammes AX-2 (Kulturen gewachsen im konventionellen, peptonhaltigen Medium).

Da uns kein radioaktiv markiertes Queuin zur Verfügung stand, konnte ein Einbau dieser Base in tRNAs nicht, wie bei ^3H -Guanin, durch eine einfache Bestimmung der mit TCA fällbaren Radioaktivität verfolgt werden. Es wurde deshalb versucht, direkt das gebildete Produkt, eine Q-haltige tRNA, nachzuweisen:

Q-freie Gesamt-tRNA aus D. discoideum AX-2 (vgl. B.2.1.) wurde mit homologem S-100-Extrakt in Gegenwart von 10^{-5} M Queuin 1 Stunde vorinkubiert, anschließend mit ^3H -Asparaginsäure aminoacyliert und über RPC-5 aufgetrennt. Ein Ansatz, dem kein Queuin zugesetzt war, diente als Kontrolle.

Abbildung B.2.4 zeigt die chromatographischen Profile dieser tRNAs: Der Zusatz von 10^{-5} M Queuin während der Vorinkubation hatte zur Folge, daß der größte Teil der Aspartyl-tRNA 10 Fraktionen früher eluierte als der ursprüngliche Q-defiziente Isoakzeptor. Da diese Retentionszeit genau der der Q-haltigen tRNA^{Asp} aus D. discoideum entspricht, muß der verwendete rohe Extrakt tatsächlich hohe Aktivitäten eines Queuin-inserierenden Enzyms enthalten. Diese Experimente sprechen dafür, daß das D. discoideum-Enzym eine bisher noch in keinem Organismus beobachtete Spezifität hat: nur Queuin wird als Substrat akzeptiert, nicht dagegen Guanin.

Abb.2.4: RPC-5-Profile von Aspartyl-tRNA: Nachweis der tRNA-Transglycosylase aus *D. discoideum*



- (—): Queuin-Insertion: 0,2 A₂₆₀ Q-freie Gesamt-tRNA aus *D. discoideum* wurden in einem 70µl-Ansatz (100mM Natriumcacodylat pH 7,5, 15mM MgCl₂, 2mM Spermidin) mit 3µg/µl tRNA-freiem S-100 aus *D. discoideum* in Gegenwart von 10⁻⁵ M Queuin 1 h vorinkubiert. (Zum Schutz der tRNA vor RNAasen wurden 0,5 A₂₆₀ 16+23S rRNA aus *E. coli* zugesetzt.) Anschließend wurde der Ansatz auf 105µl gebracht, und die tRNA mit ³H-Asp aminoacyliert; die Endkonzentrationen waren: 100mM Natriumcacodylat, 10mM MgCl₂, 1,3mM Spermidin, 6mM ATP, 20µM ³H-Asp und 6µg/µl S-100-Extrakt. Nach 10 Minuten Inkubation wurde der Ansatz phenolisiert und die tRNA isoliert und über RPC-5 aufgetrennt.
- (---): Kontrolle: behandelt wie oben - jedoch ohne Zusatz von Queuin während der Vorinkubation.

B.2.2.2. Verfahren zur Messung des Einbaus von Queuin in Q-defiziente tRNAs

Für ausgedehntere Untersuchungen der tRNA-Queuin:Guanin-Transglycosylase aus *D. discoideum*, wie sie z.B. zur Charakterisierung oder zur Anreicherung des Enzyms erforderlich sind, eignet sich die im vorigen Abschnitt beschriebene Methode der Produktanalyse durch RPC-5-Chromatographie, wegen des damit verbundenen Aufwandes, nicht. Parallel zu diesen Versuchen wurde deshalb ein schnelleres Testverfahren entwickelt, bei dem der Einbau von Queuin indirekt über die Freisetzung von ^3H -Guanin aus spezifisch an Position 34 markierter tRNA gemessen wird.

Zur Präparation der benötigten (^3H -G34)-tRNA, wurde Q-freie Gesamt-tRNA aus *D. discoideum*, nach Reinigung über Sephadex G-150, mit einer angereicherten *E. coli*-tRNA-Guanin-Transglycosylase guanyliert (vgl. B.1.8.); d.h. das unmarkierte Guanin an Position 34 der tRNAs der Q-Familie wurde durch ein tritiummarkiertes ersetzt.

Anschließend wurde die tRNA von Protein und restlichem ^3H -Guanin durch Phenolisieren, Fällen mit Ethanol und Chromatographie an DE-52 und Sephadex G-25 befreit (B.1.5., B.1.8.). Aus 10 A_{260} Q-freier Gesamt-tRNA wurden 6 A_{260} markierte Gesamt-tRNA mit 31 pmol ^3H -Guanin/ A_{260} erhalten.

Für die Durchführung des Tests werden jeweils 0,1 A_{260} dieser tRNA in 35 μl -Standardansätzen (B.1.8.) mit S-100-Extrakt und Queuin inkubiert. Das freigesetzte ^3H -Guanin wird in Entnahmen von 8 μl nach Fällung der tRNA mit 0,6M TCA durch Flüssigszintillationszählung des neutralisierten Überstandes bestimmt (vgl. B.1.8.). Gegenüber einer einfachen Messung der Abnahme der TCA-fällbaren Radioaktivität hat dieses Verfahren insbesondere dann Vorteile, wenn niedrige Einbauraten gemessen werden sollen.

B.2.2.3. Eigenschaften der tRNA-Transglycosylase in Gesamtextrakten aus *D. discoideum*

Mit der im letzten Abschnitt beschriebenen Methode, den Einbau von Queuin in tRNAs indirekt über die Freisetzung des Guanins zu bestimmen, war die Möglichkeit gegeben, diese Reaktion in Abhängigkeit von den einzelnen Komponenten zu messen, und damit die tRNA-Queuin:Guanin-Transglycosylase aus *D. discoideum* zu charakterisieren.

In den im folgenden gezeigten Kurven ist die Freisetzung von ^3H -Guanin als relativer Anteil am gesamten in der tRNA enthaltenen ^3H -Guanin aufgetragen. Die Gesamtmenge wurde dazu durch TCA-Hydrolyse der tRNA, anschließende Neutralisation und Flüssigszintillationszählung bestimmt.

Zunächst wurde die Kinetik der Reaktion bei 10^{-5} M Queuin und drei verschiedenen Konzentrationen des Enzym-Extraktes im Ansatz gemessen (Abb. B.2.5a). Die Werte wurden korrigiert um den Anteil der Radioaktivität, der in entsprechenden Ansätzen auch ohne Zugabe von Queuin freigesetzt wird (Abb. B.2.5b: Diese "Leerwerte" sind wahrscheinlich auf die Tätigkeit von RNAasen zurückzuführen, da sie durch Zusatz von 16+23S rRNA aus *E. coli* erniedrigt werden können).

Veränderungen der Magnesiumkonzentration im Ansatz im Bereich von 7,5 bis 30 mM hatten praktisch keinen Einfluß auf die Kinetik der Guaninfreisetzung.

Bei einer Variation der Konzentration der tRNA im Ansatz zeigte es sich, daß das Enzym durch diese stark hemmbar ist. (Einer weiteren Reduktion der tRNA-Menge steht in der Praxis jedoch die dann anteilmäßig höhere unspezifische Degradation entgegen.)

Da nur wenig Q-haltige tRNA^{Asn} gebildet wurde, wenn im Ansatz zur gleichen Zeit Queuin inseriert und mit Asparagin aminoacyliert wurde, wäre es möglich, daß nur die unbeladene tRNA Substrat für das Enzym ist (RPC-5-Chromatographie, o. Abb.).

Für die hohe Spezifität der tRNA-Transglycosylase aus *D. discoideum* spricht neben der Tatsache, daß Guanin nicht als Substrat erkannt wird (<1% Einbau von ^3H -Guanin in unmarkierte tRNA unter entsprechenden Bedingungen), auch der Befund, daß Guanin nicht einmal im hundertfachen Überschuß (10^{-5}M) den Einbau von Queuin (10^{-7}M) signifikant hemmt (o. Abb.).

Die Konzentration von Queuin im Ansatz wurde von 5×10^{-8} bis $3,2 \times 10^{-5}$ M variiert (Abb. B.2.6a bis 5×10^{-7} M; bei einer weiteren Erhöhung der Queuinmenge verändert sich der Kurvenverlauf praktisch nicht mehr). Eine Hemmung der Reaktion durch Queuin tritt nicht auf. Bereits 1 pmol Queuin im Ansatz ($= 3 \times 10^{-8}$ M) ergibt eine deutlich meßbare Reaktion (Abb. B.2.6b).

Unter Zuhilfenahme der Eichkurven, die von E. Zubrod bei der praktischen Anwendung des Tests zur Queuinbestimmung in Geweben ermittelt wurden, konnte ein Lineweaver-Burk-Plot der Reaktion erstellt werden (Abb. B.2.7): Der abzulesende K_m -Wert des Enzyms liegt mit 1×10^{-7} M ähnlich wie bei den bisher bekannten eukaryontischen tRNA-Queuin:Guanin-Transglycosylasen (Säuger: $4,5 \times 10^{-8}$ M; Katze und Farkas, 1979; Weizenkeimlinge: $9,5 \times 10^{-8}$ M, Walden et al., 1982). Aus dem linearen Verlauf der Kurve ist zu entnehmen, daß das als Substrat verwendete Gemisch von tRNAs innerhalb des zur Auswertung herangezogenen Zeitraums von 0,5 Stunden (max. 36% Freisetzung) als homogen betrachtet werden kann.

Legende zu Abb. B.2.5:

- (a) In 35 μ l-Standardansätzen mit 0,1 A₂₆₀ (³H-G34)-tRNA und 10^{-5} M Queuin als Substrat wurde tRNA-freier S-100-Extrakt aus *D. discoideum* in den folgenden Konzentrationen eingesetzt (Proteinkonz.):
 (-Δ-) 1,5 μ g/ μ l, (-O-) 3 μ g/ μ l und (-●-) 6 μ g/ μ l.
 (b) Zugehörige Leerwerte ohne Queuinzugabe

Ordinatenwerte: freigesetzter Anteil(%) des gesamten, in der tRNA enthaltenen ³H-Guanins (100% = 2400 cpm).

Die Werte in (a) sind korrigiert um die Leerwerte aus (b).

Legende zu Abb. B.2.6:

- (a) Kinetik der Freisetzung von ³H-Guanin in 35 μ l-Standardansätzen (0,1 A₂₆₀ (³H-G34)-tRNA; 3 μ g/ μ l S-100-Protein) mit
 (-■-) 0,5, (-Δ-) 0,25, (-O-) 0,1 und (-▲-) 0,05 μ M Queuin.
 (b) Der nach 2 Stunden in diesen Ansätzen erreichte Anteil an freigesetztem ³H-Guanin ist aufgetragen gegen die Queuinkonzentration.

Abb. B.2.5: Freisetzung von ^3H -Guanin aus an Position 34 markierter tRNA durch Queuin: Variation der Enzymkonzentration

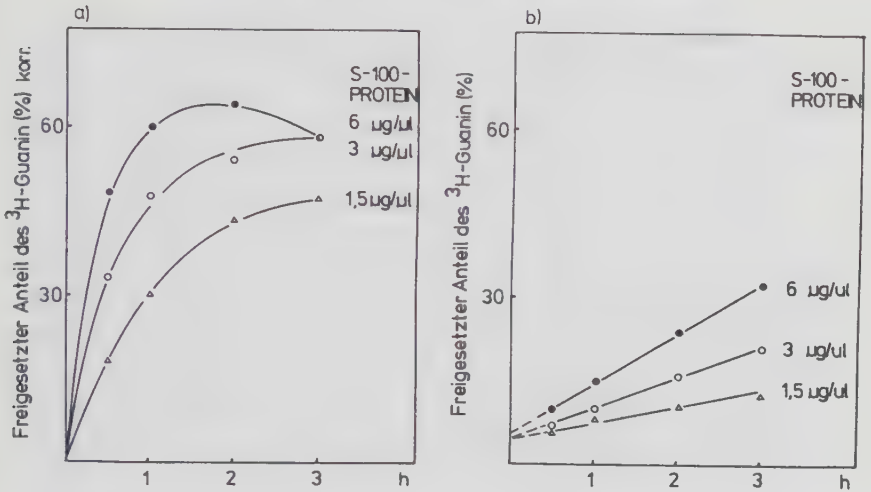


Abb. B.2.6: Freisetzung von ^3H -Guanin aus an Position 34 markierter tRNA durch Queuin: Variation der Queuinkonzentration

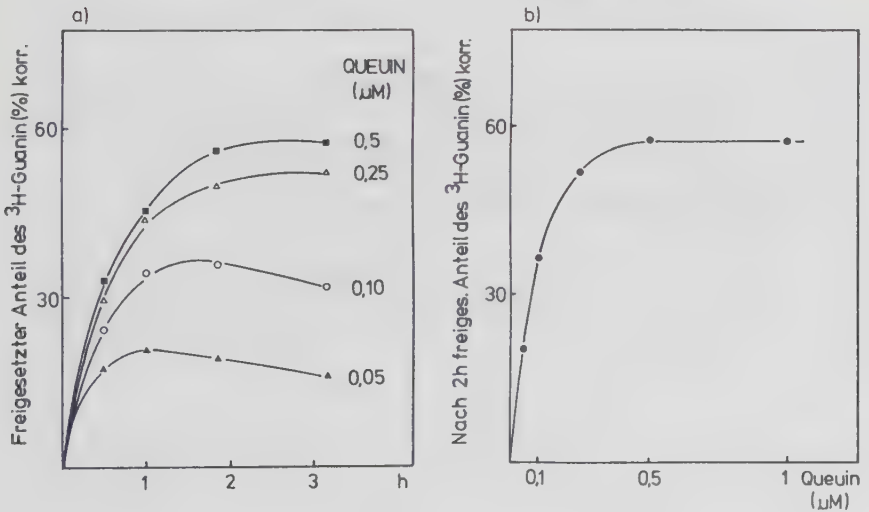
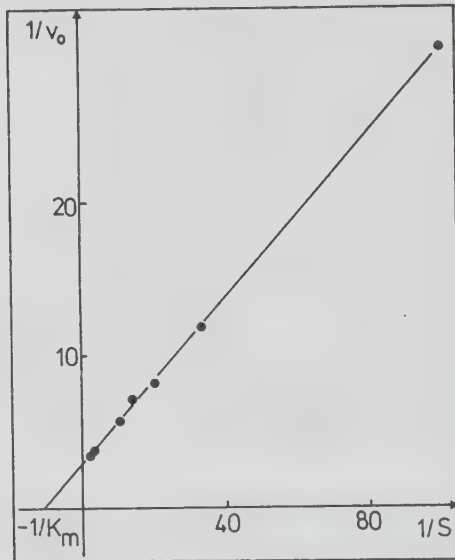


Abb. B.2.7: Lineweaver-Burk-Plot: K_m -Wert der tRNA-Queuin:Guanin-Transglycosylase aus *D. discoideum* für Queuin



S : Queuin-Konzentration im Ansatz ($\mu\text{mol/l}$)

v_0 : als Maß für v_0 wurde der nach 0,5 Stunden aus der tRNA freigesetzte Anteil des ^3H -Guanins aufgetragen (100% = 1).

Reaktionsbedingungen s. Legende zu Abb. B.2.6.

B.2.3. Erhöhter Turnover von tRNAs, die an Position 34 Guanosin anstelle von Queuosin-Derivaten tragen

Die Versuche in Kapitel B.2.1. haben gezeigt, daß *D. discoideum* Queuin nicht selbst synthetisiert und somit auf die exogene Zufuhr dieser Base angewiesen ist. In seiner natürlichen Umgebung wird der Schleimpilz von den Bakterien, auf denen er wächst, ausreichend mit Queuin versorgt (weniger als 8% Q-defiziente tRNAs).

Wird *D. discoideum* in einem axenischen pepton- und damit Q-freien Medium gezüchtet, so enthalten die tRNAs der Q-Familie an Position 34 ausschließlich Guanosin; erst nach Zusatz von 10^{-7} M Queuin zum Medium werden sie - katalysiert durch die im vorigen Abschnitt beschriebene tRNA-Queuin:Guanin-Transglycosylase - praktisch vollständig bezüglich Q modifiziert (<2,5% Q-defiziente tRNAs). tRNA-Präparationen aus logarithmisch im peptonfreien Medium gewachsenen Kulturen von *D. discoideum* AX-2 werden im weiteren als "(-Q)-" bzw. "(+Q)-Gesamt-tRNA" bezeichnet, je nach dem, ob dem Medium kein oder 10^{-7} M Queuin zugesetzt wurde.

In den folgenden Versuchen wurde der Stamm AX-2 verwendet, um den Einfluß von Q auf die intrazellulären Spiegel einzelner tRNAs zu untersuchen. Zur Bestimmung der tRNA-Mengen wurden zwei voneinander unabhängige Methoden angewandt:

- (i) Aminoacylierungsreaktionen und
- (ii) eine Quantifizierung der in vivo mit 32 P markierten tRNAs nach Trennung über 2D-Gelelektrophorese.

Es konnte gezeigt werden, daß in (+Q)-Gesamt-tRNA die relativen Mengen von tRNA^{Asp} und tRNA^{Tyr} gegenüber (-Q)-Gesamt-tRNA bis auf das Doppelte erhöht sind, während der Anteil der für Asn, His, Phe und Ser spezifischen tRNAs unverändert ist.

Der Mechanismus, der zu dieser Erhöhung führt, wurde im letzten Teil dieser Arbeit untersucht.

B.2.3.1. Aminoacylierbarkeit der tRNAs aus *D. discoideum* in Abhängigkeit vom Queuingehalt des Mediums

Im Rahmen der Versuche, mit denen *D. discoideum* AX-2 als Modellsystem zur Untersuchung der Funktion von Q eingeführt wurde, wurden aus (+Q)- und (-Q)-Zellen gewonnene Gesamt-tRNAs auch mit Asparaginsäure beladen. Dabei ergab sich ein überraschender Befund: tRNA-Präparationen aus Q-freien Kulturen waren deutlich schlechter mit Asp aminoacylierbar, als tRNAs aus Kulturen, die in Gegenwart von Queuin gezüchtet worden waren. Ausgehend von dieser Beobachtung wurde im folgenden die Beladbarkeit verschiedener (+Q)- und (-Q)-Gesamt-tRNAs mit den Aminosäuren der Q-Familie und mit Phe und Ser zum Vergleich bestimmt.

Vor der Beladung mit den radioaktiven Aminosäuren wurde die tRNAs nach der Methode von Schofield und Zamecnik (1968) quantitativ deacyliert. Das relativ aufwendige aber schonende Verfahren der Cu^{2+} -katalysierten Deacylierung wurde aufgrund von Vorversuchen gewählt: Bei Gesamt-tRNA aus *D. discoideum* AX-2 (aus peptonhaltigem Medium) führte diese Methode zu einer Steigerung der Beladbarkeit mit Asn, Phe, Ser und Tyr um 10-20%, während die übliche Behandlung mit 1,8M Tris HCl pH 8,0 (37°C, 90 min; Palatnik et al., 1977) die Aminoacylierbarkeit nicht verbesserte.

Tabelle B.2.2 zeigt die Ergebnisse der Aminoacylierung von (+Q)- und (-Q)-Gesamt-tRNAs, die in zwei voneinander unabhängigen Experimenten jeweils parallel präpariert und über Sephadex G-150 gereinigt wurden: Die Q-haltigen Präparationen sind, bezogen auf 1 A_{260} Gesamt-tRNA, etwa doppelt so hoch mit Asp und Tyr beladbar wie die Q-defizienten. In weiteren (weniger gereinigten) Präparationen wurde ebenfalls eine mindestens um den Faktor 1,5 höhere Aminoacylierbarkeit der Q-haltigen Gesamt-tRNA für Asp und Tyr gefunden. Für die anderen beiden Aminosäuren der Q-Familie, Asn und His konnten, wie für Phe und Ser, keine Unterschiede festgestellt werden.

Tab. B.2.2: Aminoacylierbarkeit von tRNAs aus Kulturen von AX-2 im peptonfreien Medium

Aminosäure	Beladbarkeit: pmol AS / A ₂₆₀ Gesamt-tRNA ⁺		relative Beladbarkeit (+Q) / (-Q)	
	(+Q)	(-Q)	I	II
Asn	86	80	1.12	1.08
His	40	43	1.01	0.88
Asp	76	37	2.22	1.82
Tyr	54	29	1.92	1.82
Phe	42	41	0.98	1.05
Ser	139	144	0.93	1.02

(-Q): D. discoideum AX-2 im peptonfreien Medium ohne Queuin-Zusatz

(+Q): D. discoideum AX-2 im peptonfreien Medium mit 10⁻⁷ M Queuin

⁺) Die Werte sind Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

Unter den gegebenen Bedingungen (Gesamt-tRNA, S-100-Extrakt als Enzym) zeigten die Kinetiken der Beladung von (+Q)- und (-Q)-Gesamt-tRNAs mit Asp und Tyr (Asp: Abb. B.2.8) keine signifikanten Unterschiede. Dieser Befund stimmt mit neueren Ergebnissen von Singhal und Vakharia (1983) überein, nach denen sich die K_m - und v_{max} -Werte der Aminoacylierung von (+Q)- und (-Q)-tRNA^{Asp} nur geringfügig unterscheiden ((+Q)-tRNA: v_{max} +30%; K_m -55%). Die früher beschriebene Erhöhung von v_{max} um den Faktor 16 (Singhal und Kopper, 1981) führen die Autoren selbst auf einen methodischen Fehler zurück.

In Abbildung B.2.9 sind die RPC-5-Profile der Aspartyl- und Tyrosyl-tRNAs aus (+Q)- und (-Q)-Gesamt-tRNA gezeigt: Beim Zusatz von Queuin zum Medium treten keine neuen zusätzlichen Isoakzeptoren in den Profilen auf, das veränderte Elutionsverhalten der tRNAs ist die Folge des Austauschs von G an Position 34 gegen Q.

Abb. B.2.8: Kinetik der Aminoacylierung mit Asp: (+Q)- und (-Q)-tRNA

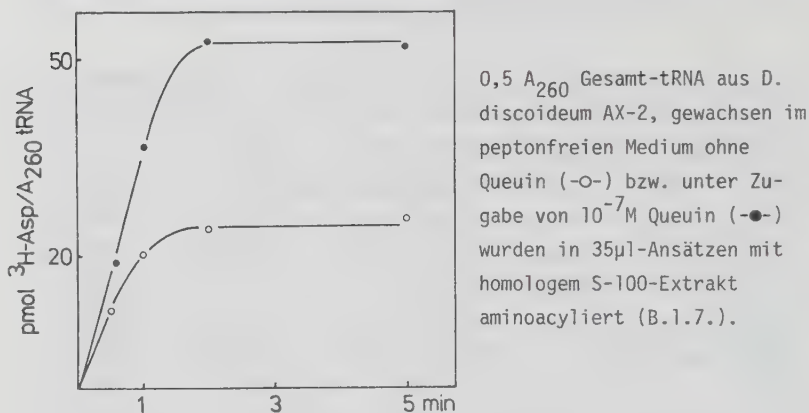
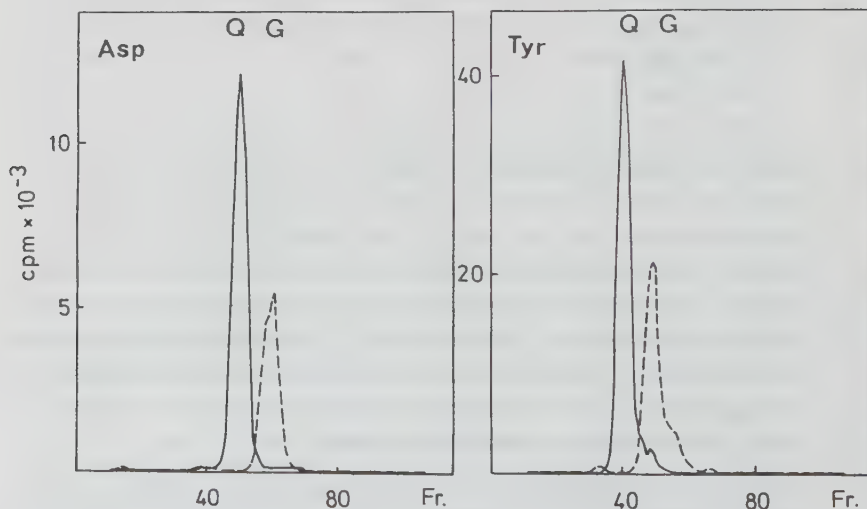


Abb. B.2.9: RPC-5-Profile von Aspartyl-tRNA und Tyrosyl-tRNA



Die tRNA wurde aus Zellen von *D. discoideum* AX-2 isoliert, die im peptonfreien Medium gewachsen waren (Einzelheiten: Abb. B.2.2):

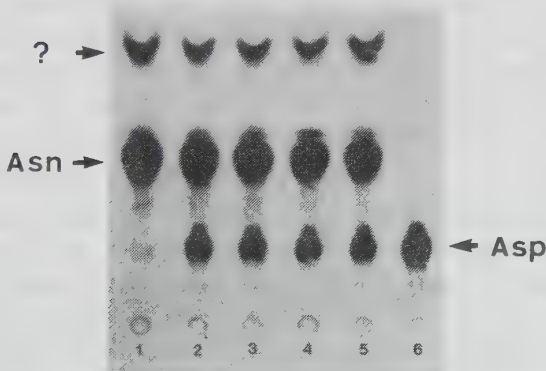
(—) 10⁻⁷M Queuin im Medium / (---) kein Queuin im Medium

Bei pH 4,5 wird durch Q eine zusätzliche positive Ladung in die tRNAs eingeführt, die das chromatographische Profil um etwa 10 Fraktionen zu niedrigeren Salzkonzentrationen hin verschiebt.

Anmerkung:

Bei allen hier vorgestellten Experimenten, in denen tRNA mit Asn aminoacyliert wurde, enthielten die Reaktionsansätze noch unmarkierte Asparaginsäure (B.1.7.): Asn wird durch im S-100-Extrakt von *D. discoideum* vorhandene Asparaginase-Aktivitäten ungewöhnlich rasch zu Asp desaminiert (Abb. B.2.10), wodurch eine Fehlbeladung der tRNA^{Asp} mit Asn vorgetäuscht werden kann. Eine Zugabe von unmarkierter Asparaginsäure reduziert die Aminoacylierung durch das entstehende ³H- oder ¹⁴C-Asp so weit, daß sie zu vernachlässigen ist.

Abb. B.2.10: Desaminierung von ³H-Asn zu ³H-Asp in Aminoacylierungsansätzen (Fluorographie)



Aminoacylierungsansätze (B.1.7., Asn, 3µg/µl S-100-Extrakt) ohne tRNA wurden 35 min bei 22°C inkubiert. Anschließend wurde mit 10%iger TCA gefällt und der Überstand nach Neutralisation mit Aminfreon (Khym, 1975) dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. (Cellulose, Merck - Laufmittel CHCl₃ / Methanol / NH₃ conc. : 2 / 2 / 0,9 (v/v)).

Ansatzbedingungen:

- 2: 20µM ³H-Asn + 17 weitere Aminosäuren ohne Asp je 20µM (unmark.)
- 3: 20µM ³H-Asn + 17 weitere Aminosäuren je 20µM + 40µM Asp (unmark.)
- 4: 20µM ³H-Asn
- 5: 20µM ³H-Asn + 40µM Asp (unmark.)

(1: ³H-Asn-Vergleichslösung - 6: ³H-Asp-Vergleichslösung)

B.2.3.2. Quantifizierung der in vivo mit ^{32}P markierten tRNAs aus *D. discoideum* nach Trennung über 2D-Gelelektrophorese

Im Muster der tRNA aus *D. discoideum* AX-2 nach 2D-Gelelektrophorese konnten zahlreichen Flecken bereits spezifische tRNAs zugeordnet werden (Dingermann, 1980). Das Auflösungsvermögen der Gele ließ sich weiter erhöhen (B.1.9.1.). Damit waren alle Voraussetzungen geschaffen, dieses Verfahren zur Quantifizierung einzelner tRNAs in (+Q)- und (-Q)-Gesamt-tRNA einzusetzen: Der Vorteil einer solchen Mengenbestimmung liegt darin, daß sie unabhängig von den im vorigen Abschnitt untersuchten Aminoacylierungsreaktionen ist.

Identifizierung einzelner tRNAs im Muster der 2D-Gelelektrophorese

Die von Th. Dingermann (1980) getroffene Zuordnung der spezifischen tRNAs zu den einzelnen Gelflecken erfolgte unter Verwendung von tRNA aus *D. discoideum* AX-2, der im peptonhaltigen Medium gewachsen war. Es war deshalb erforderlich, diese Ergebnisse nochmals mit den im folgenden eingesetzten tRNAs aus peptonfrei gezüchteten Kulturen zu überprüfen.

Unmarkierte Q-haltige(+Q) und Q-defiziente(-Q) tRNA-Präparationen wurden hierfür parallel zu den ^{32}P -markierten (s.u.; Abb. B.11) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Um die Aminoacylierbarkeit der tRNAs nicht durch eine Färbung der Gele mit Ethidiumbromid zu beeinträchtigen, erfolgte die Detektion der Nucleinsäuren nur durch die in B.1.9.2. beschriebene Methode der Fluoreszenzlöschung nach Unterlegen einer imprägnierten DC-Platte.

Aus den Gelen wurden ausgewählte Flecken ausgestochen und die darin enthaltenen tRNAs eluiert (B.1.9.3.). Proben dieser Eluate wurden analytisch mit ^3H -Asn, ^3H -Asp und ^3H -Tyr beladen. (Zur Reduktion der Leerwerte durch Zugabe der entsprechenden unmarkierten Aminosäuren vor der Probenentnahme vgl. B.1.9.3.). Die Ergebnisse sind in Tabelle B.2.3 zusammengefaßt:

Für tRNA^{Asp} und tRNA^{Tyr} konnte die von Th. Dingermann getroffene Zuordnung zu Fleck 16 bzw. 30 ganz eindeutig bestätigt werden (vgl. Abb. B.2.11). tRNA^{Asn} dagegen wurde nur in Fleck 15, nicht aber in Fleck 16 gefunden. Experimente, bei denen den Aminoacylierungsan-

sätzen keine unmarkierte Asparaginsäure zugesetzt wurde, zeigen, daß die damaligen Ergebnisse wahrscheinlich auf einer im Ansatz erfolgten Desaminierung von ^3H -Asn zu ^3H -Asp beruhen (s. Anhang zu B.2.2.2).

Tab. B.2.3: Identifizierung spezifischer tRNAs nach 2D-Gelelektrophorese durch Aminoacylierung der eluierten Nucleinsäuren

Aminosäure (Spez. Aktiv.)	tRNA-Präparation	Beladbarkeit der eluierten tRNA (cpm)							
		Flecknummer							
		2	11	13	15	16	22	28	30
Asn ⁺ (15Ci/mmol)	+Q	230 (668)	237 (696)	235 (650)	<u>4022</u> (7248)	873 (7702)	262 (717)	358 (883)	307* (794)
	-Q	239 (612)	270 (560)	261 (650)	<u>1643</u> (3136)	505 (4071)	289 (627)	372 (798)	283* (738)
Asp (6 Ci/mmol)	+Q	827	781	799	2408	<u>13883</u>	848	782	740
	-Q	744	762	646	1423	<u>4806</u>	688	776	806
Tyr (30Ci/mmol)	+Q	4640	4765	3868	4987	4867	4328	4862	<u>91062</u>
	-Q	4203	4551	4404	4684	4302	4145	4349	<u>72950</u>

⁺) Die geringe Beladbarkeit der tRNA aus Fleck 16 mit Asn dürfte auf eine nicht ganz quantitative Abtrennung von Fleck 15 zurückzuführen sein (vgl. Asp). In Klammern stehen die Werte von Ansätzen, in denen bei der Aminoacylierung kein unmarkiertes Asp zugesetzt wurde.

*) Die Ansätze dieser Reihen enthielten nur einen 0,4 (sonst 0,5) A₂₆₀ Gesamt-tRNA entsprechenden Anteil an extrahierten Nucleinsäuren.

Quantifizierung der ^{32}P -markierten tRNAs aus *D. discoideum* AX-2

Die Mengenverhältnisse einzelner tRNAs wurden in Abhängigkeit vom Queuingehalt des Mediums ermittelt. Hierzu wurden Kulturen, die im peptonfreien (phosphatarmen) Medium ohne oder mit 10^{-7} M Queuin wuchsen, während der log-Phase über zwei Generationen mit ^{32}P -Ortho-phosphat markiert (2,5 mCi ^{32}P / 20 ml Kultur, vgl. B.1.3.): Am Ende der Markierungsperiode, d.h. bei 3×10^6 Zellen/ml, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und mit dem Vierfachen des Feuchtgewichtes an unmarkierten Carrier-Zellen versetzt. Jeweils 0,5 - 1 A_{260} ($= 1-3 \times 10^6$ cpm) der hieraus isolierten tRNAs wurden durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt.

In Abbildung B.2.11 (s. S.95) sind die Autoradiogramme von Gelen mit Q-defizienter und Q-haltiger Gesamt-tRNA aus *D. discoideum* gezeigt: Beim alkalischen pH-Wert des Trennpuffers (pH 8,3), beeinflusst der Austausch des Guanins an Position 34 der tRNAs gegen Queuin, deren elektrophoretische Mobilität praktisch nicht.

Zum quantitativen Vergleich der spezifischen tRNAs in den (-Q)- und (+Q)-Präparationen, wurden alle auf den Roentgenfilmen deutlich sichtbaren Flecken aus den Gelen ausgestochen; die darin enthaltene ^{32}P -Radioaktivität wurde über ihre Cerenkov-Strahlung gemessen (B.1.9.2). Eine Zusammenfassung der Auswertung von je zwei Gelen, auf denen Q-defiziente bzw. Q-haltige tRNAs aufgetrennt wurden, gibt Tabelle B.2.4. Der Vergleich einander entsprechender Flecken aus Gelen von (-Q)- und (+Q)-tRNAs ergab keine signifikanten Unterschiede im Gehalt an ^{32}P -markierter tRNA - mit einer Ausnahme: in Fleck 16, in dem tRNA^{Asp} läuft, findet sich 60% mehr ^{32}P -markierte tRNA, wenn die Zellen in Gegenwart von Queuin gewachsen sind.

Die bei der Beladung der Gesamt-tRNAs mit den Aminosäuren der Q-Familie in (+Q)-Präparationen gefundene Erhöhung des Gehaltes an tRNA^{Asp} (B.2.3.1.), konnte somit bestätigt werden. Nach den Ergebnissen der Aminoacylierungen wären jedoch auch Unterschiede im Fleck 30, der tRNA^{Tyr} enthält, zu erwarten:

Eine weitere Auftrennung der aus diesem Fleck eluierten Nucleinsäuren über RPC-5 zeigt, warum eine Quantifizierung nach der verwendeten 2D-Gelelektrophorese nicht geeignet ist, um tRNA^{Tyr} mengenmäßig zu bestimmen (Abb. B.2.12a): Fleck 30, der stärkste Einzelfleck im Gel,

enthält mindestens noch zwei weitere tRNAs. Bei der Aminoacylierung wurde gefunden, daß nach Zusatz von Queuin zum Medium tRNA^{Tyr} etwas schwächer ansteigt als tRNA^{Asp}. Danach würde die Gesamtradioaktivität in Fleck 30 nur um etwas mehr als 10% ansteigen - gefunden wurden 4%. Da die relative Standardabweichung der Methode, bestimmt für 40 Paare einander entsprechender Flecken jeweils einer Präparation $((+Q)/(+Q) \text{ und } (-Q)/(-Q))$, 10,9% beträgt, kann eine Veränderung des tRNA^{Tyr}-Gehaltes bei der Anwesenheit von zwei weiteren tRNAs in Fleck 30 nicht sicher gemessen werden.

Um festzustellen, ob auch Fleck 16 neben tRNA^{Asp} noch weitere tRNAs enthält, wurden die, aus diesen Gelstücken eluierten Nucleinsäuren ebenfalls über RPC-5 aufgetrennt (Abb. B.2.12b). In (+Q)- und (-Q)-Präparationen trat jeweils nur ein Gipfel auf, und zwar exakt an der Stelle im Chromatogramm, an der auch der entsprechende, nicht aminoacylierte Isoakzeptor ((Q34) bzw. (G34)) von tRNA^{Asp} aus *D. discoideum* eluiert. Dieser Befund, sowie die fehlende Beladbarkeit dieser tRNA mit Asn, spricht genauso wie das im folgenden Abschnitt abgebildete Muster der enthaltenen modifizierten Nucleoside dafür, daß in Fleck 16 reine tRNA^{Asp} vorliegt.

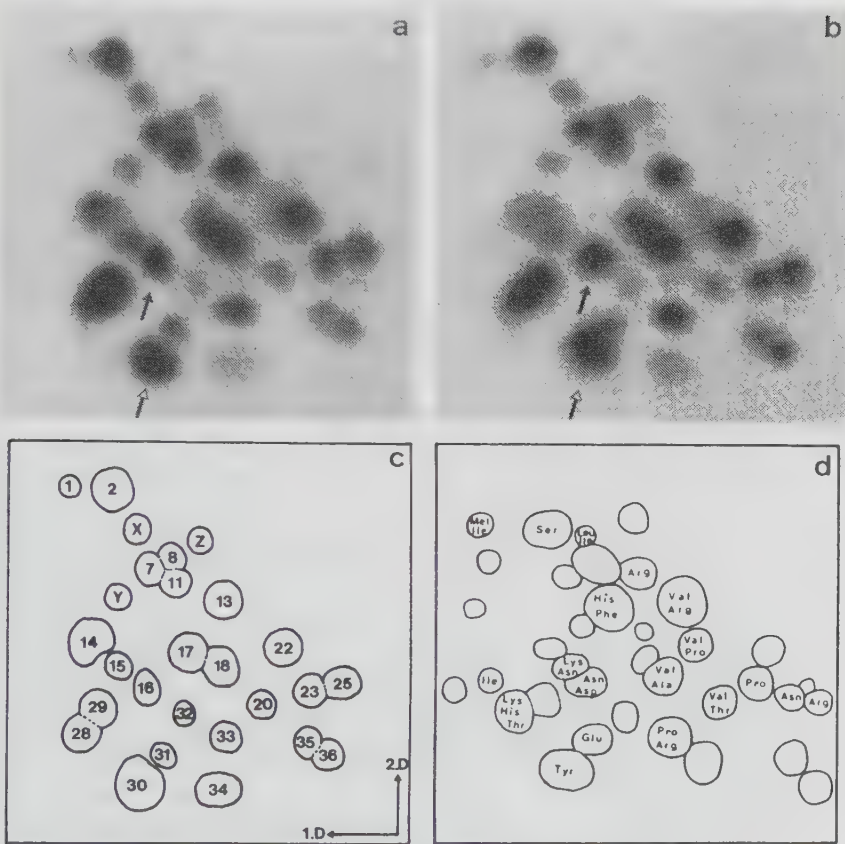
Mit zwei voneinander unabhängigen Methoden ist damit gezeigt, daß der Spiegel von tRNA^{Asp} in Zellen, die unter Zusatz von Queuin gewachsen sind, höher ist, als in Zellen, die Q-frei gezüchtet wurden: Die über die Aminoacylierung von Gesamt-tRNA mit Asp gemessene Erhöhung lag zwischen 1,5- und 2-fach, die nach der 2D-Gelelektrophorese bestimmte, betrug das 1,6-fache.

Tab. B.2.4: Quantifizierung der in den Gelflecken enthaltenen Nucleinsäuren durch Messung der Cerenkov-Strahlung von ^{32}P

Fleck	Radioaktivität im Fleck als Anteil(%) der Radioaktivität aller Flecken				Verhältnis (+Q) / (-Q)
	(+Q)-Gesamt-tRNA		(-Q)-Gesamt-tRNA		
	Gel I	Gel II	Gel III	Gel IV	
1	1,07	1,10	1,01	1,19	0,99
2	4,84	5,33	5,59	5,94	0,88
7, 8, 11 ⁺	9,53	9,16	9,80	9,80	0,95
13	5,50	5,08	5,21	6,48	0,91
14	4,13	4,83	4,54	4,53	0,99
15	3,44	3,24	3,20	3,07	1,07
16	<u>6,52</u>	<u>5,77</u>	<u>4,03</u>	<u>3,77</u>	<u>1,58</u>
17, 18 ⁺	10,52	11,66	11,34	12,16	0,94
20	2,27	2,32	2,55	2,33	0,94
22	5,97	5,82	4,83	5,80	1,11
23, 25 ⁺	7,16	7,04	7,59	5,57	1,08
28, 29 ⁺	11,22	11,28	11,59	11,73	0,96
30	8,46	8,08	8,26	7,59	1,04
31	2,05	1,82	2,31	2,26	0,85
32	1,87	1,79	2,01	1,76	0,97
33	3,59	3,57	3,53	3,85	0,97
34	2,07	2,17	1,96	2,04	1,06
35, 36 ⁺	4,01	4,06	4,48	3,06	1,07
X	2,29	2,17	2,72	2,61	0,84
Y	1,96	1,81	2,00	2,20	0,90
Z	1,53	1,89	1,47	2,27	0,91

⁺) Für sehr dicht beieinander liegende Flecken kann bei der verwendeten Methode nur die Summe der darin enthaltenen Radioaktivität mit ausreichender Sicherheit angegeben werden.

Abb. B.2.11: Autoradiogramme: 2D-Gele von ^{32}P -markierten tRNAs



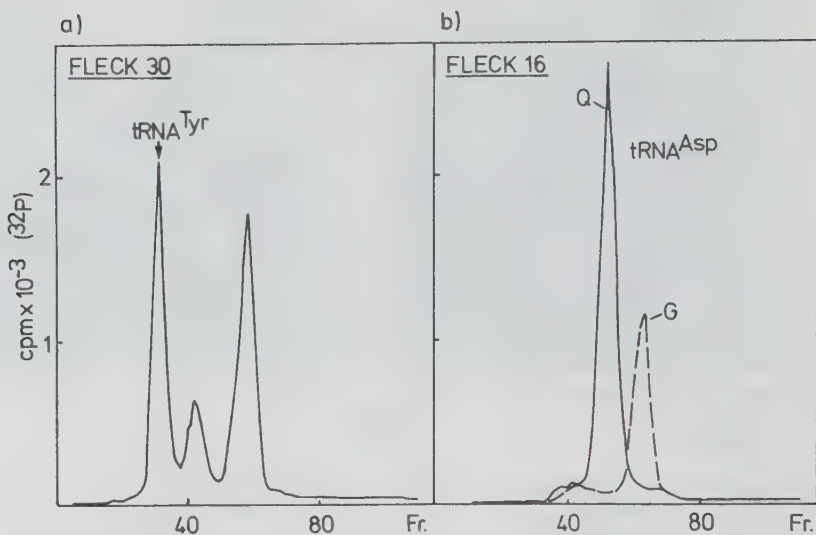
Zellen des Stammes AX-2 wurden im peptonfreien Medium, dem kein (a) bzw. 10^{-7} M Queuin (b) zugesetzt wurde, über zwei Generationen mit ^{32}P -Ortho-phosphat markiert (B.1.3.). Zur Trennung der isolierten tRNAs vgl. B.1.9.

Die Flecken (c) wurden entsprechend dem von Dingermann (1980) für tRNA aus Kulturen im peptonhaltigen Medium angegebenen Schema nummeriert.

Der schwarze Pfeil in (a) und (b) zeigt auf Fleck 16, der tRNA^{Asp} enthält, der offene Pfeil auf Fleck 30, in dem tRNA^{Tyr} läuft.

Zum Vergleich ist in (d) ein aus Dingermann et al. (1981) entnommenes Schema der bisher identifizierten tRNAs abgebildet.

Abb. B.2.12: Trennung der in Fleck 30 und 16 enthaltenen tRNAs durch RPC-5-Chromatographie



(a) Aus dem in Abb. B.2.11b gezeigten Gel ((+Q)-Präparation) wurde der Fleck 30, in dem tRNA^{Tyr} läuft, ausgestochen. Die aus den Gelstücken eluierten ^{32}P -Nucleinsäuren wurden über RPC-5 aufgetrennt: Außer tRNA^{Tyr} enthält Fleck 30 noch mindestens zwei weitere tRNAs.

(b) RPC-5-Profile der aus dem Fleck 16 der Gele in Abb. B.2.11 eluierten ^{32}P -Nucleinsäuren:

(—): tRNA aus *D. discoideum* AX-2, der unter Zusatz von 10^{-7} M Queuin gewachsen ist (Abb. B.2.11b)

(---): tRNA aus *D. discoideum* AX-2 im queuinfreien Medium (Abb. B.2.11a)

In beiden Präparationen tritt nur je ein Gipfel auf, dessen Retentionszeit der von unbeladener (Q34)- bzw. (G34)- tRNA^{Asp} genau entspricht.

B.2.3.3. Charakterisierung der Q*-Derivate in *D. discoideum* AX-2

tRNA^{Asp} und tRNA^{Tyr} unterscheiden sich in vielen Eukaryonten (Kasai et al., 1975a) von den anderen tRNAs der Q-Familie (tRNA^{Asn}, tRNA^{His}) dadurch, daß sie an Position 34 nicht Q selbst, sondern hypermodifizierte Derivate, Q* enthalten. Die 4-Hydroxylgruppe des Cyclopentendiolringes von Q ist bei Q* glycosyliert: Als Zuckerreste konnten Mannose (tRNA^{Asp}) und Galactose (tRNA^{Tyr}) identifiziert werden (Kasai et al., 1976).

Das Verhalten der tRNAs aus *D. discoideum* gegenüber Perjodat zeigt, daß tRNA^{Asp} und tRNA^{Tyr} auch in diesem Organismus ein modifiziertes Q* tragen: Während die in (Q+)-tRNA^{Asn} freie cis-Diol-Gruppierung von Queuin gespalten wird, wodurch sich die Retentionszeit der tRNA bei der RPC-5-Chromatographie deutlich verlängert (B.2.1.2.), bleibt das Elutionsprofil von (Q+)-tRNA^{Asp} und (Q+)-tRNA^{Tyr} nach einer Behandlung mit diesem Reagenz praktisch unverändert (nicht gezeigte Ergebnisse und Pistel, 1982).

Der Anteil der Q-Derivate beträgt in Gesamt-tRNA nur etwa 0,1 Mol% aller Nucleoside, daher ist ihr direkter Nachweis in Gesamt-tRNA mit konventionellen Nucleosidanalysen nicht möglich. Nach der Elektrophorese der in vivo mit ³²P markierten tRNAs aus *D. discoideum*, lagen tRNA^{Asp} und tRNA^{Tyr} (siehe Fleck 16 bzw. 30 in Abb. B.2.11) in reiner bzw. angereicherter Form vor. Zur Nucleotidanalyse nach Nishimura (1972; Kasai et al., 1975a) wurden diese tRNAs aus den Gelen eluiert, mit RNAase T₂ verdaut, und die entstehenden 3'-³²P-Nucleotide zweidimensional auf Celluloseplatten getrennt:

Im Dünnschichtchromatogramm mit tRNA^{Tyr} aus Fleck 30 tritt bei Zugabe von Queuin zum Medium ein zusätzliches Nucleotid auf, das das für Q* beschriebene Laufverhalten besitzt (Abb. B.2.13a; vgl. Okada und Nishimura, 1977). Auch in tRNA^{Asp} (aus Fleck 16) findet sich unter diesen Bedingungen ein zusätzliches Nucleotid; - die Position des zugehörigen Flecks in der 2D-DC ist jedoch weit von den Stellen entfernt, an denen Q und Q* kartiert wurden (Abb. B.2.13b). Da die zur Verdauung der tRNA verwendete RNAase T₂ keine Phosphodiesterbindungen spaltet, die auf ribosemethylierte Nucleoside folgen, wäre es denkbar, daß der gefundene Fleck ein Dinucleotid der Struktur

NmpQ*p ist. - Hiergegen spricht jedoch, daß

- (i) in Elongations-tRNAs an Position 33 ein unmodifiziertes Uridin hochkonserviert ist (Gauss und Sprinzl, 1983), und daß
- (ii) kein entsprechendes G-haltiges Dinucleotid in der Q-defizienten tRNA^{Asp} gefunden wurde.

Es wird deshalb vermutet, daß tRNA^{Asp} in *D. discoideum* ein neues, bisher unidentifiziertes Derivat von Q enthält.

Legende zu Abb. B.2.13:

Die aus den 2D-Gelen der in vivo mit ^{32}P markierten tRNAs aus *D. discoideum* (B.2.2.3.) eluierten Nucleinsäuren wurden mit RNAase T₂ verdaut, und die entstehenden 3'-Nucleotide nach Nishimura (1972) aufgetrennt.

(a) Fleck 30 - tRNA^{Tyr} u.a.:

Bei Zugabe von Queuin zum Medium (Mitte) tritt ein zusätzliches Nucleotid (Pfeil) auf, dessen Laufverhalten dem von Q* entspricht (Okada und Nishimura, 1977). (Im DC der tRNA aus Q-frei gewachsenen Kulturen (oben) ist an der entsprechenden Stelle nur ein ganz schwacher Fleck eben sichtbar.)

(b) Fleck 16 - tRNA^{Asp}:

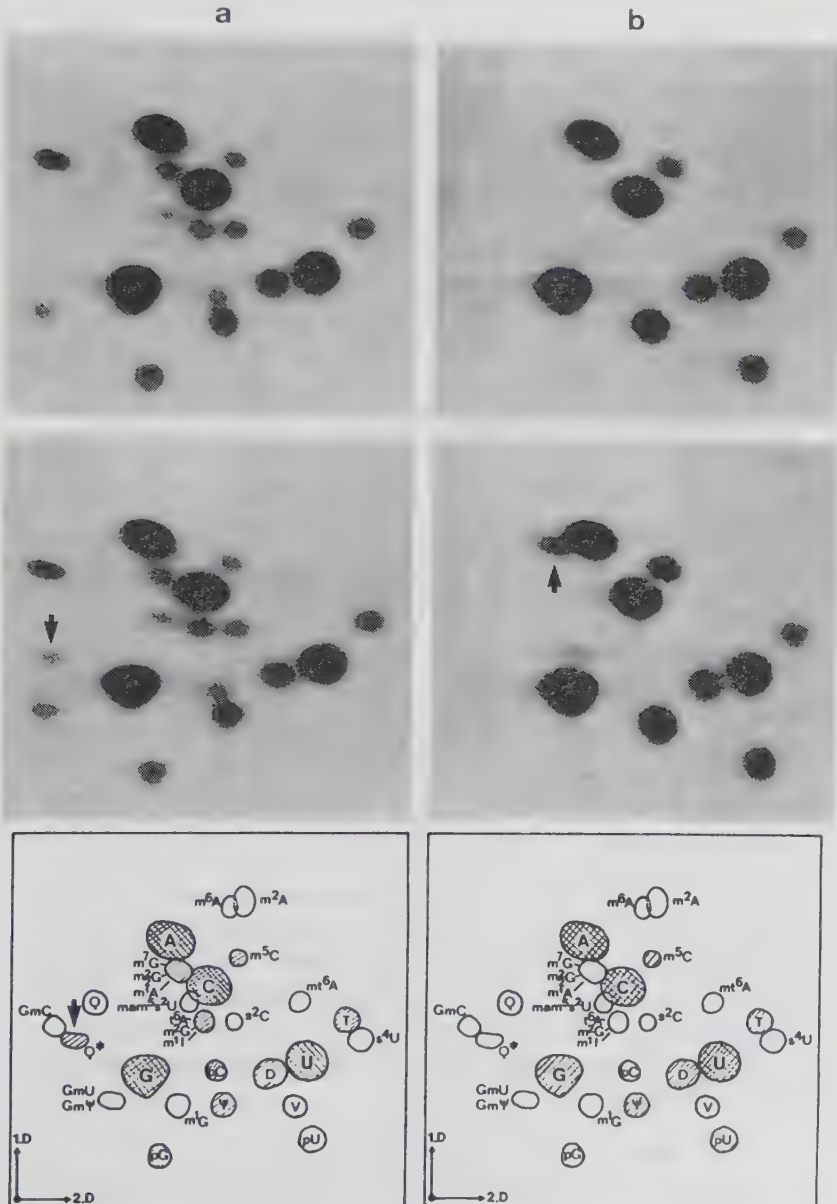
Wenn das Medium kein Queuin enthält (oben), sind die modifizierten Nucleoside in dieser tRNA genau die gleichen, die in (Q)-tRNA^{Asp} aus *Drosophila* gefunden wurden (Wosnick und White, 1978):
U, D, m⁵C und T.

Die mittlere Abbildung zeigt das Nucleotidmuster dieser tRNA aus Kulturen, die in Gegenwart von 10^{-7}M Queuin gewachsen sind:

Das zusätzlich auftretende Nucleotid (Pfeil) wurde bisher noch nicht beschrieben. Da tRNA^{Asp} unempfindlich ist gegen Perjodat, ist anzunehmen, daß es sich um ein neues Derivat von Q* handelt.

Unten: Schema bisher im Nishimura-System kartierter Nucleotide - Flecken, die im Nucleotidmuster der tRNAs auftreten, sind schraffiert.

Abb. B.2.13: 2D-Dünnschichtchromatogramme der ^{32}P -markierten Nucleotide aus gelelektrophoretisch gereinigten tRNAs



B.2.3.4. Bestimmung der intrazellulären Stabilität der tRNAs der Q-Familie in *D. discoideum* AX-2

Prinzipiell sind zwei Mechanismen denkbar, die zur Erhöhung der intrazellulären Spiegel von tRNA^{Asp} und tRNA^{Tyr} beim Zusatz von Queuin zum Medium führen könnten: Zum einen wäre es möglich, daß Queuin die Synthese dieser tRNAs stimuliert, zum anderen könnten aber auch die gebildeten (Q+)-tRNAs langsamer abgebaut werden, als die entsprechenden unmodifizierten tRNAs mit G an Position 34.

Von einem verzögerten Abbau sollten tRNA^{Asn}(Q34) und tRNA^{His}(Q34) nicht betroffen sein, da ihre Spiegel unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Queuin im Medium sind. Erst die weitere Modifikation von Q in tRNA^{Tyr} und tRNA^{Asp} könnte diese tRNAs vor Degradation schützen. In Zellen, in denen die Neusynthese von tRNA gehemmt wird, sollten die Spiegel der G-haltigen tRNA^{Asp} und tRNA^{Tyr} infolge des Abbaus rascher abfallen, als die der entsprechenden tRNAs mit Q* an Position 34. Für tRNA^{Asn} und tRNA^{His} dagegen, sollten keine Unterschiede zwischen den Isoakzeptoren mit Q34 und G34 zu beobachten sein.

Als Hemmstoff der RNA-Synthese in logarithmisch wachsenden Zellen von *D. discoideum* AX-2 wurde im folgenden Actinomycin C verwendet. Dieses Antibiotikum lagert sich in die DNA-Matrize ein und hemmt dabei bevorzugt die Transkription von RNA. In eukaryontischen Zellkulturen (L-Zellen) wird die Synthese der ribosomalen RNAs bereits durch einen Zusatz von 0,05 µg/ml Actinomycin gehemmt, während für die tRNAs Konzentrationen von 5 µg/ml erforderlich sind. Erst bei noch höheren Konzentrationen wird auch die DNA-Synthese und damit das Wachstum vollständig blockiert (Balis, 1968; Scott und Tomkins, 1975).

Vorversuche ergaben, daß in Kulturen von *D. discoideum* AX-2 das Wachstum durch eine Zugabe von 10 µg/ml Actinomycin C zum Medium für mehr als 6 Stunden blockiert wird. Im folgenden wurden Konzentrationen dieses Antibiotikums eingesetzt, die mit 100 µg/ml noch zehnfach über diesem Wert lagen (B.1.4.). Die unter diesen Bedingungen aus den Zellen isolierbare Menge an Gesamt-tRNA nahm im Verlauf der sechsstündigen Hemmung um etwa 15% ab.

D. discoideum AX-2 im peptonhaltigen Medium

Zellen von *D. discoideum* AX-2, die im konventionellen Medium in Gegenwart von Pepton gezüchtet wurden, enthalten nebeneinander modifizierte, Q-haltige und unmodifizierte, G-haltige tRNAs.

Einer logarithmisch in diesem Medium wachsenden Kultur wurden 100 µg/ml Actinomycin bei einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml zugesetzt (B.1.4.). Aus Proben vor der Antibiotikazugabe, sowie nach 1,5 und 6 Stunden Hemmung, wurden jeweils die Gesamt-tRNAs präpariert, mit ^3H -Asp bzw. ^3H -Asn aminoacyliert und über RPC-5 aufgetrennt:

Nach Hemmung der Synthese von tRNA ist eine rasche Abnahme des Q-defizienten Isoakzeptors von tRNA^{Asp} zu beobachten, während die Menge des Q*-haltigen Isoakzeptors über den gesamten Zeitraum praktisch konstant bleibt. Das Versuchsergebnis stützt die angeführte Arbeitshypothese, nach der (G34)- tRNA^{Asp} empfindlicher gegen eine intrazelluläre Degradation sein sollte, als die entsprechende modifizierte tRNA mit einem Q*-Derivat an Position 34.

D. discoideum im peptonfreien Medium ohne bzw. mit 10^{-7}M Queuin

Bei der Hemmung der tRNA-Synthese in *D. discoideum* im peptonhaltigen Medium, wurden auch vergleichsweise geringfügige Veränderungen im Isoakzeptorenmuster von tRNA^{Asn} (Abb. B.2.14b) gefunden; sie dürften auf eine Nachmodifikation der (G34)- tRNA^{Asn} unter Verwendung von Queuosin, das beim allgemeinen tRNA-Abbau anfällt, zurückzuführen sein. Die hierfür erforderliche enzymatische Aktivität, die kürzlich von Gündüz und Katze (1982) aufgrund von Studien des Queuin-Turnovers in Vero-Zellen postuliert wurde, konnte für *D. discoideum* mit Hilfe des in Kapitel B.2.2. erstellten Tests zur Bestimmung der Insertion von Queuin nachgewiesen werden (E. Zubrod, Dissertation):

Wird den Reaktionsansätzen statt Queuin ein durch Verdauung von Q-haltiger Gesamt-tRNA gewonnenes Nucleosidgemisch zugesetzt, so ist eine langsame Freisetzung von ^3H -Guanin aus den spezifisch an Position 34 markierten tRNAs der Q-Familie durch den *D. discoideum*-Enzym-Extrakt zu beobachten. Ein Nucleosidgemisch aus Q-defizienter tRNA führt zu keiner Reaktion.

Um eine Überlagerung der Effekte des tRNA-Abbaus mit denen einer Wiederverwendung von Queuosin zu umgehen, wurden in einer zweiten

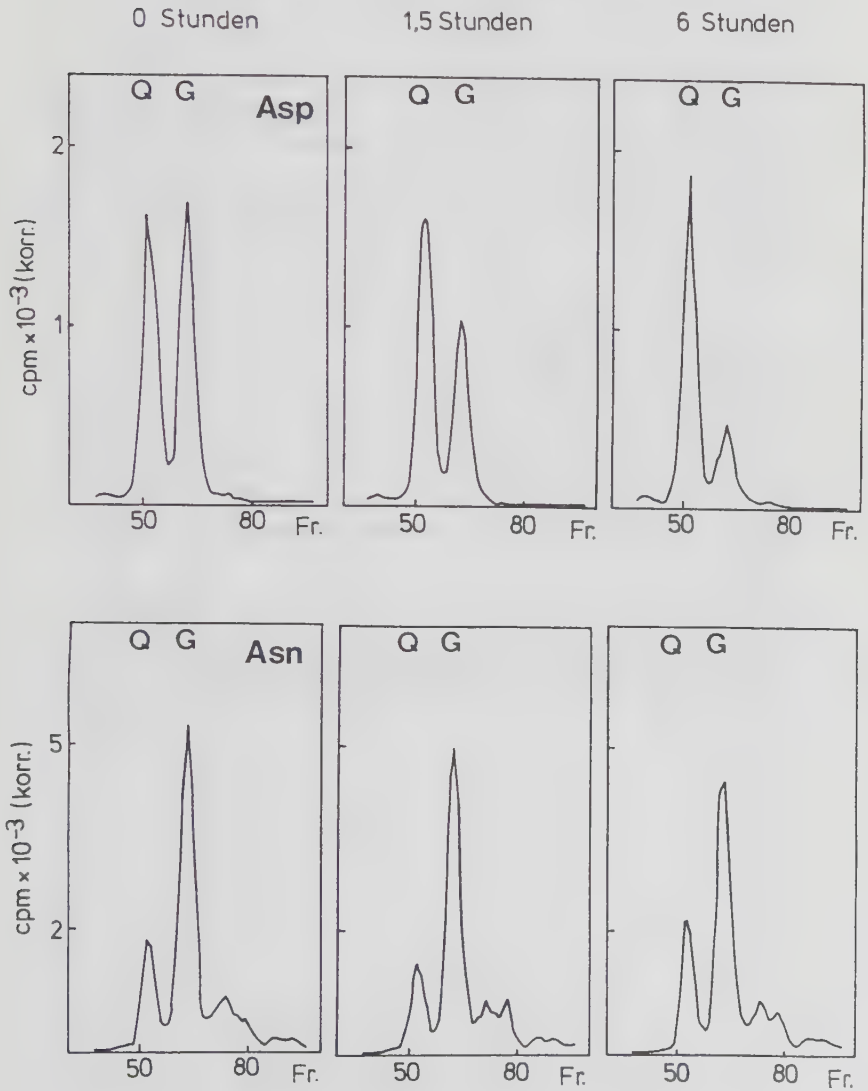
Serie von Versuchen Kulturen im peptonfreien Medium, denen kein bzw. 10^{-7} M Queuin zugesetzt war, untersucht.

Hierzu wurde unmittelbar vor der Zugabe von Actinomycin C ($100\mu\text{g/ml}$ bei $3,5 \times 10^6$ Zellen/ml), sowie 0,5, 1,5, 3,5 und 6 Stunden später aus diesen Kulturen Gesamt-tRNA isoliert und deren Aminoacylierbarkeit mit den Aminosäuren der Q-Familie und - zum Vergleich - mit Phe und Ser bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung B.2.15 dargestellt: Aus dem Kurvenverlauf, der für die Vergleichs-tRNAs, tRNA^{Phe} und tRNA^{Ser} erhalten wurde, ist ersichtlich, daß sich deren Anteil an der Gesamt-tRNA-Menge während der beobachteten sechsständigen Hemmung nicht ändert. Auswirkungen des Queuingehaltes im Medium waren nicht festzustellen.

Bei den tRNAs der Q-Familie zeigten sich durch die An- bzw. Abwesenheit von Queuin im Medium bedingte Veränderungen nur für tRNA^{Asp} und tRNA^{Tyr} : Der Anteil dieser tRNAs an der Gesamt-tRNA nimmt bei Hemmung der RNA-Synthese in Zellen, die queuinfrei gewachsen sind, relativ rasch ab, während er in Zellen, die unter Zusatz von Queuin gezüchtet wurden konstant bleibt oder sogar leicht ansteigt.

tRNA^{Asp} und tRNA^{Tyr} werden also, wenn sie Q* bzw. ein Derivat von Q* enthalten, intrazellulär langsamer abgebaut, als wenn sie an Position 34 nur ein unmodifiziertes G tragen. Aus dem Verhalten von tRNA^{Asn} und tRNA^{His} , bei denen der bloße Ersatz von G34 durch Q ohne anschließende weitere Modifikation keine meßbare Erhöhung der intrazellulären Stabilität bedingt, geht hervor, daß die Hypermodifikation zu Q* hierbei eine entscheidende Rolle spielt.

Abb. B.2.14: RPC-5-Profile von Aspartyl-tRNA und AsparaginyI-tRNA
während der Hemmung der RNA-Synthese durch Actinomycin C



Legende zu Abb. B.2.14:

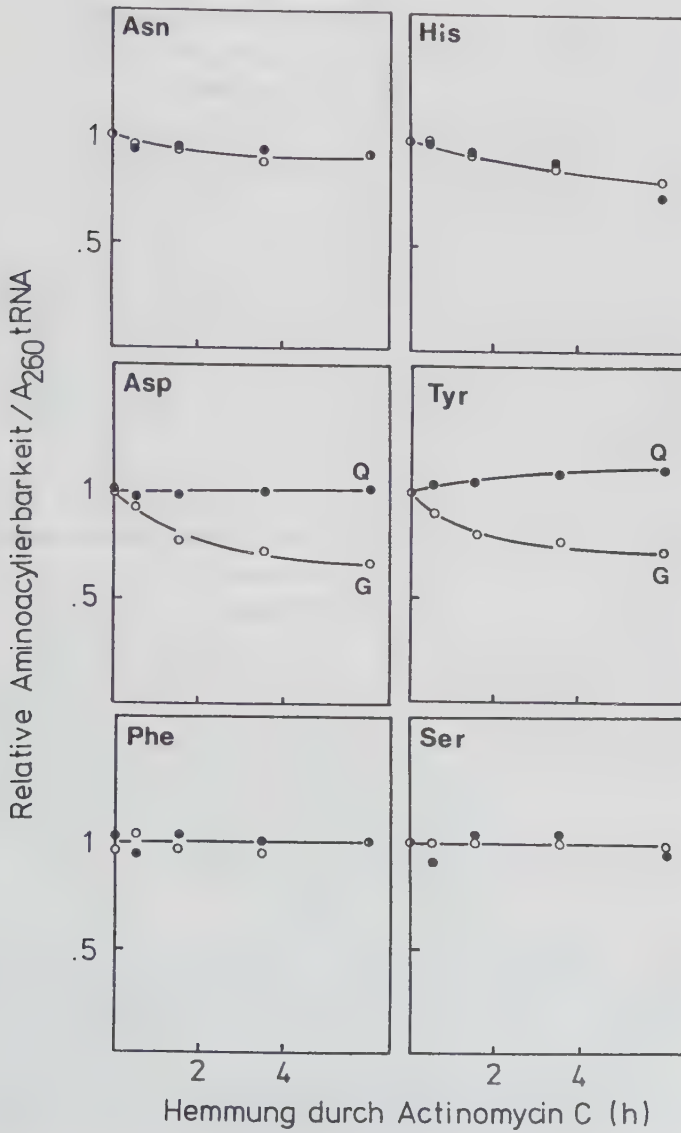
Zu logarithmisch im konventionellen, peptonhaltigen Medium wachsenden Kulturen (250ml), wurden bei 5×10^6 Zellen/ml $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Actinomycin C zugesetzt. Aus Proben von 45 ml wurden die tRNAs isoliert und anschließend mit ^3H -Asp (oben) oder ^3H -Asn (unten) aminoacyliert. Die Dauer der Hemmung betrug (von links nach rechts): 0, 1,5 und 6 h. Die cpm-Werte wurden so korrigiert, daß die Flächen unter den Kurven, der jeweiligen Beladbarkeit der tRNA-Präparation mit der verwendeten Aminosäure entsprechen. Hierdurch wird eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch Schwankungen in der Wiederfindungsrate der tRNAs ausgeschlossen ($\leq \pm 10\%$ zwischen den einzelnen Läufen).

Legende zu Abb. B.2.15:

D. discoideum AX-2 wurde im peptonfreien Medium gezüchtet, dem kein (-○-) bzw. 10^{-7}M Queuin (-●-) zugesetzt war. Unmittelbar vor der Zugabe von Actinomycin C ($100\mu\text{g}/\text{ml}$ bei $3,5 \times 10^6$ Zellen/ml), sowie 0,5, 1,5, 3,5 und 6 Stunden später wurden Proben entnommen, aus denen die tRNA isoliert und mit den jeweils angegebenen Aminosäuren beladen wurde.

Die Plateauwerte der Aminoacylierungen, bezogen auf $1 \text{ A}_{260} \text{ tRNA}$, wurden gegen die Zeitdauer der Hemmung mit Actinomycin aufgetragen. Zum besseren Vergleich wurde die Beladbarkeit der tRNAs vor der Hemmung der Zellen (ermittelt aus den angepaßten Kurven) als 1 gesetzt.

Abb. B.2.15: Veränderung der relativen tRNA-Spiegel in *D. discoideum* während der Hemmung der RNA-Synthese durch Actinomycin C



B.3. DISKUSSION

Das 7-Deazaguanosinderivat Queuosin (Q) findet sich in Eubakterien und in Eukaryonten (außer in Hefen) an der ersten Position des Anticodons der für Asparagin, Asparaginsäure, Histidin und Tyrosin spezifischen tRNAs ("Q-Familie" der tRNAs, vgl. Gauss und Sprinzl, 1983).

Trotz ausgedehnter Grundlagenarbeiten, in denen Veränderungen des Q-Gehaltes dieser tRNAs bei der malignen Entartung (Okada et al., 1978; Roe et al., 1979; Singhal et al., 1981; Zubrod, 1982; Kersten et al., 1984) und der Differenzierung (Landin et al., 1979; Lin et al., 1980; Shindo-Okada et al., 1981) von Geweben gemessen wurden, ist die eigentliche Funktion von Queuin bei diesen Prozessen bis heute ungeklärt. Ein wesentlicher Grund dafür ist sicher der Umstand, daß bisher als einziges Testsystem zur Lösung dieser Frage nur Q-frei gezüchtete Mäuse zur Verfügung standen, die experimentell viel zu aufwendig für ausgedehntere Untersuchungen sind (Katze und Beck, 1980; Reyniers et al., 1981): Da diese Tiere, wie wahrscheinlich eine ganze Reihe weiterer Organismen (Katze et al., 1982), nicht in der Lage sind, Queuin selbst zu synthetisieren, kann bei ihnen durch eine keimfreie Haltung über mehrere Monate und eine Fütterung mit Q-freier Diät eine praktisch vollständige Q-Defizienz der tRNAs erreicht werden.

Ein gut eingeführtes Modellsystem für Differenzierungsprozesse ist der niedere Eukaryont *D. discoideum*; er durchläuft bei Nahrungsentzug in etwa 24 Stunden einen Entwicklungszyklus im Verlauf dessen zwei verschiedene Zelltypen gebildet werden: Stielzellen und Sporenzellen. Wenn Amöben des axenisch wachsenden Stammes AX-2 im konventionellen, peptonhaltigen Medium gezüchtet werden, enthalten sie größere Mengen Q-defizienter tRNAs neben modifizierten tRNAs mit Q an Position 34 (Dingermann et al., 1981; Pistel, 1982).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß *D. discoideum* als einfach zu handhabendes Modellsystem zur Untersuchung der funktionellen Rolle von Q verwendet werden kann, da dieser Organismus zur Modifikation seiner tRNAs auf die exogene Zufuhr von Queuin angewiesen ist: Wird der Stamm AX-2 in einem synthetischen Medium gezüchtet, das mit Hefeextrakt supplementiert, aber frei von Pepton - und damit frei von Q - ist, so tragen die tRNAs der Q-Familie in diesen Zellen aus-

schließlich Guanosin an Position 34. Schon bei Zugabe von 10^{-7} M Queuin zum Medium, werden diese tRNAs nahezu vollständig modifiziert ($\leq 2,5\%$ Q-defiziente tRNAs).

Ein Einfluß von Queuin auf die Wachstumsrate der Kulturen ist nicht festzustellen. Für die Sporenkeimung und die Differenzierung der Amoeben zu Stiel- und Sporenzellen ist Queuin nicht essentiell; - es beschleunigt jedoch beide Vorgänge, wie morphologisch und anhand von biochemischen Markern in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen wurde (Schachner und Kersten, 1984): Die Bindung von cAMP an die Oberflächenrezeptoren steigt bei Zusatz von Queuin zum Medium nach einem Nahrungsentzug früher und stärker an; Mengenveränderungen, die für drei Proteine am Anfang des Entwicklungszyklus beobachtet werden, treten ebenfalls früher auf, wenn dem Medium Queuin zugegeben wird.

In Eukaryonten werden die tRNAs der Q-Familie durch das Enzym tRNA-Queuin:Guanin-Transglycosylase modifiziert, das Guanin an Position 34 gegen Queuin - aber auch gegen Guanin - austauscht. Bei allen bisher beschriebenen tRNA-Queuin:Guanin-Transglycosylasen unterscheiden sich die K_m -Werte für Queuin und Guanin höchstens um einen Faktor drei (Katze und Farkas, 1979). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß dieses Enzym in *D. discoideum* eine einzigartig hohe Substratspezifität für Queuin besitzt: Guanin reagiert praktisch nicht und hemmt auch im hundertfachen Überschuß den Einbau von Queuin nicht signifikant. Eine Messung der Freisetzung von ^3H -Guanin aus spezifisch an Position 34 mit Hilfe der *E. coli*-tRNA-Guanin-Transglycosylase markierter Q-defizienter Gesamt-tRNA ergab einen K_m -Wert für Queuin von 10^{-7} M (Säuger: $4,5 \times 10^{-8}$ M, Katze und Farkas, 1979; Weizenkeimlinge: $9,5 \times 10^{-8}$ M, Walden et al., 1982).

Ein biologischer Grund für diese hohe Spezifität des *D. discoideum*-Enzyms könnte in der Ernährungsweise des Organismus liegen: Der Schleimpilz nimmt in seiner natürlichen Umgebung seine Nährstoffe durch Phagozytose von Bakterien auf, die ihn, wie in dieser Arbeit für den Wildtypstamm NC-4 gezeigt, auch ausreichend mit Q versorgen ($\leq 8\%$ Q-defiziente tRNAs bei Züchtung auf *E. coli* B/r). Da beim Abbau von bakterieller Gesamt-tRNA ein Vielfaches der Queuinmenge an Guanin freigesetzt wird, könnte die gefundene hohe Substratspezifität dieses Enzyms eine wichtige Voraussetzung für die Verwertbarkeit

dieser modifizierten Base sein.

Zur Modifikation der tRNAs von *D. discoideum* unter Verwendung von Q aus der tRNA der phagozytierten Bakterien, ist neben der eigentlichen tRNA-Transglycosylase noch eine N-Glycosidase erforderlich, die Queuin aus dem zunächst entstehenden Nucleosid Queuosin freisetzt. Die Existenz eines solchen Enzyms wurde kürzlich von Gündüz und Katze (1982) aufgrund von Studien des Queuin-Turnovers in Säugerzellen (Vero-Zellen) postuliert. Für *D. discoideum* konnte diese Aktivität inzwischen mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Tests zur Bestimmung der Insertion von Queuin in tRNAs nachgewiesen werden.

Das Queuosin-verwertende Enzymsystem könnte auch bei der Wiederverwendung von Queuosin aus dem endogenen tRNA-Turnover des Schleimpilzes von Bedeutung sein, da sich die relativen Spiegel der Q-defizienten tRNAs während des Entwicklungszyklus (d.h. in Abwesenheit einer exogenen Quelle von Queu(os)in) ändern. Auch im Verhältnis der einzelnen Q-defizienten tRNAs zueinander treten während dieses Zeitraums starke Verschiebungen auf (Pistel, Diss. 1982).

Unter Verwendung des oben vorgestellten Modellsystems - queuinfrei und in Gegenwart von Queuin gezüchteter *D. discoideum* AX-2 - konnte in unserem Arbeitskreis gezeigt werden, daß die An- bzw. Abwesenheit von Queuin im Medium, verschiedene Redoxsysteme des Schleimpilzes beeinflusst (Schachner et al., 1984): Ein Cytochrom b_{559} tritt bei Nahrungsentzug nur dann in nennenswertem Umfang auf, wenn dem Medium kein Queuin zugesetzt wird. Während der Differenzierung wurden spezifische Veränderungen im Muster der D- und L-Lactatdehydrogenasen, sowie in den Spiegeln der zugehörigen Substrate D- und L-Lactat gefunden. Nach 24 Stunden Mangel haben Q-freie Zellen deutlich niedrigere Spiegel an D-Lactat als Q-haltige Zellen - gleichzeitig verlieren sie ihre Fähigkeit zu differenzieren: Möglicherweise kann D-Lactat den Q-haltigen Zellen als Energiequelle dienen, während es in den Q-freien Zellen durch eine Oxidoreductase (in Analogie zu Hefen u.U. identisch mit dem Cytochrom b_{559} ; Pajot und Claisse, 1974) verbraucht wurde (Schachner et al., 1984).

Als Mechanismus über den die modifizierte Base Queuin oder die zugehörigen Q-defizienten bzw. Q-haltigen tRNAs in Eukaryonten solche Veränderungen in der Genexpression auslösen können, ist ein Angriff

sowohl auf der Transkriptions- als auch auf der Translationsebene denkbar. Für eine Kontrolle der Translation durch die jeweils vorhandenen Mengen der G- bzw. Q-haltigen Isoakzeptoren gibt es bereits erste experimentelle Hinweise:

Im Gegensatz zu früheren Experimenten von Smith und McNamara (1982), in denen im Reticulocytensystem kein Unterschied im Leseverhalten Q-defizienter und Q-haltiger tRNAs festgestellt wurde, konnten Kubli und Grosjean (persönl. Mitteilung) kürzlich im intakten *Xenopus*-Oocyten bei der Translation von TYMV-RNA nachweisen, daß (G34)tRNA^{His} eine deutliche Präferenz für das Codon CAC besitzt, während die entsprechende Q-haltige tRNA CAU ähnlich gut liest wie CAC.

Bereits 1981 hatten Bienz und Kubli im selben Translationssystem gefunden, daß (G34)tRNA^{Tyr} ein Amber-Stoppcodon in der TMV-RNA supprimieren kann, (Q34)tRNA^{Tyr} dagegen nicht. Eine solche Suppression könnte dazu dienen, geringe definierte Mengen eines Regulatorpeptids zu synthetisieren: in *E. coli* z.B. ist der aktive Repressor des Tryptophan-Operons ein solches Durchleseprodukt (Engelberg-Kulka et al., 1981). Verantwortlich für das Ausmaß, in dem ein solches Peptid gebildet wird, ist die Menge an aminoacylierter "Suppressor"-tRNA - im *E. coli*-Beispiel normale tRNA^{Trp}, bei der TMV-RNA (G34)tRNA^{Tyr}.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß ein Zusatz von 10^{-7} M Queuin zum Q-freien Nährmedium von *D. discoideum* AX-2 außer zu einer fast vollständigen Modifikation der tRNAs der Q-Familie auch zu spezifischen Veränderungen im zellulären Gehalt der tRNAs führt, die anstelle von Q ein glycosyliertes Derivat, Q* enthalten:

Eine Bestimmung der Aminoacylierbarkeit von Gesamt-tRNA ergab, daß Zellen, die in Gegenwart von Queuin gewachsen sind, fast doppelt soviel tRNA^{Asp} und tRNA^{Tyr} enthalten, wie Zellen aus queuinfreiem Medium. Die Spiegel der beiden anderen tRNAs der Q-Familie (tRNA^{Asn} und tRNA^{His}) dagegen, sind vom Queuingehalt des Mediums unabhängig, genauso wie die von zwei zum Vergleich bestimmten tRNAs, die nicht zur Q-Familie gehören (tRNA^{Phe} und tRNA^{Ser}).

Der relative Anstieg des zellulären Gehaltes an tRNA^{Asp} bei Zusatz von Queuin zum Medium konnte nach einer Markierung der Amoeben mit ³²P-Orthophosphat noch durch eine Quantifizierung der durch 2D-Gel-

elektrophorese aufgetrennten tRNAs bestätigt werden (Messung der Cerenkov-Strahlung von ^{32}P).

Wird die Neusynthese von RNA in logarithmisch wachsenden Amöben durch Actinomycin C gehemmt, und die Degradation einzelner tRNAs über 6 Stunden verfolgt, so zeigt sich eine rasche Abnahme des Anteils der unmodifizierten tRNA^{Asp} mit G an Position 34, während die Menge des Q-haltigen Isoakzeptors praktisch konstant bleibt (Zellen aus konventionellem, peptonhaltigen Medium; RPC-5-Chromatographie). Das Verhältnis der Isoakzeptoren von tRNA^{Asn} mit G34 bzw. Q34 ändert sich im betrachteten Zeitraum nur wenig.

In queuinfrei gewachsenen Zellen (peptonfreies Medium) sanken nach einer Hemmung der RNA-Synthese durch Actinomycin die Spiegel von tRNA^{Asp} und tRNA^{Tyr} weit schneller ab, als in Zellen, die in Gegenwart von 10^{-7} M Queuin gezüchtet wurden. Für die anderen beiden tRNAs der Q-Familie (tRNA^{Asn} und tRNA^{His}) und für zwei Vergleichs-tRNAs (tRNA^{Phe} und tRNA^{Ser}) wurden keine queuinabhängigen Unterschiede gefunden.

Die in *D. discoideum* AX-2 nach Zusatz von Queuin zum peptonfreien Medium auftretende Erhöhung der Spiegel von tRNA^{Asp} und tRNA^{Tyr} kann somit auf eine Erhöhung ihrer intrazellulären Stabilität zurückgeführt werden. In Einklang mit diesen Ergebnissen können die vergleichsweise geringen Verschiebungen im Isoakzeptorenmuster von tRNA^{Asn}, die während der Actinomycinhemmung beobachtet wurden, durch eine Nachmodifikation der Q-defizienten tRNA^{Asn} erklärt werden, die durch eine Wiederverwendung des beim allgemeinen tRNA-Turnover anfallenden Nucleosids Queuosin möglich ist.

Die beiden tRNAs (tRNA^{Asp} und tRNA^{Tyr}), deren intrazelluläre Stabilität nach einer Zugabe von Queuin zum Medium erhöht wird, enthalten in *D. discoideum*, wie in vielen anderen Eukaryonten (Kasai et al., 1975a) auch, nicht Q selbst (tRNA^{Asn}, tRNA^{His}), sondern hypermodifizierte Derivate davon, die stabil gegen eine Behandlung mit Perjodat sind. In den bisher bekannten, mit Q* bezeichneten Derivaten ist die 4-Hydroxylgruppe des Cyclopentendiolringes von Q glycosyliert, wobei als Zuckerreste Mannose (Asp) und Galactose (Tyr) gefunden wurden (Kasai et al., 1976).

Eine Nucleotidanalyse der in vivo mit ^{32}P markierten und über 2D-Gel-elektrophorese gereinigten tRNAs aus *D. discoideum* zeigte, daß das in tRNA^{Tyr} vorkommende Derivat von Queuosin in seiner dünnschichtchromatographischen Mobilität dem bekannten Q* entspricht; - tRNA^{Asp} dagegen enthält ein neues, bisher unidentifiziertes Derivat dieses hypermodifizierten Nucleosids.

Das Verhalten von tRNA^{Asn} und tRNA^{His} , bei denen der bloße Ersatz des G an Position 34 durch Q ohne anschließende Glycosylierung zu Q* keine meßbare Erhöhung der intrazellulären Stabilität bedingt, deutet darauf hin, daß die Hypermodifikation von Q zu Q* bei diesen Vorgängen eine entscheidende Rolle spielt.

Erhöhungen der zellulären Spiegel einzelner tRNAs, die durch einen verminderten tRNA-Turnover bedingt werden, wurden erstmals von Litt und Howell-Litt (1980) in Friend-Leukämie-Zellen nach Entzug von Aminosäuren nachgewiesen. Sie konnten zeigen, daß in diesem Fall eine verringerte Aminoacylierung der tRNAs, deren Degradation reduziert. Da das in der vorliegenden Arbeit verwendete Medium sehr hohe Konzentrationen an freien Aminosäuren enthält (Tyrosin z.B. nahe der Sättigungslöslichkeit), dürfte eine Unterbeladung der Q*-haltigen Isoakzeptoren in *D. discoideum* als Erklärung für ihre erhöhte Stabilität ausscheiden, zumal das v_{max} der Aminoacylierung für die Q-haltige tRNA^{Asp} sogar höher ist als für die Q-defiziente und der K_m -Wert gleichzeitig niedriger (Singhal und Vakharia, 1983). Bei einem kurzfristigen Aminosäuremangel in *D. discoideum* wurde nur für tRNA^{Asn} - und zwar nur für den G-haltigen Isoakzeptor - eine zwischenzeitlich stärkere Unterbeladung gefunden, nicht jedoch für tRNA^{Asp} oder tRNA^{Tyr} (Dingermann et al., 1981).

Eine Erklärung für die beobachtete Stabilisierung der tRNAs wäre, daß durch die Modifikation von Q zu Q* der Angriff von RNAasen erschwert wird. tRNA^{Asp} könnte besonders instabil sein, da sie nur sehr wenige modifizierte Nucleoside (T, D, U, m⁵C) enthält. Hefe- tRNA^{Asp} , in der kein Q vorkommt, enthält ein zusätzliches m¹G an Position 37 in der Anticodonschleife (Gangloff et al., 1972), das ihre Stabilität erhöhen könnte.

Kanerva und Maenpää (1981) zeigten, daß bei der Estrogeninduktion von Vitellogenin in Vogelleber die Halbwertszeiten der Isoakzeptoren

von tRNA^{Ser} selektiv erhöht werden. Als Folge davon nimmt der zelluläre Gehalt an tRNA^{Ser}(AGU,C) zu.

Verantwortlich dafür, dürften Veränderungen in der Aktivität spezifischer tRNA-inaktivierender Enzyme nach der Estrogeninduktion sein, wie sie von Grover et al. (1979) beschrieben wurden.

Als Funktion der Veränderungen der relativen Isoakzeptormengen von tRNA^{Ser} wird bei den Vogelleberzellen eine Anpassung der tRNA-Spiegel an die Häufigkeit der zu translatierenden Codons ("Codon-Usage") diskutiert (Kanerva und Maenpaae, 1981).

Bei der Q-Familie der tRNAs könnte ein präferentieller Abbau der (G34)tRNA^{Asp} und (G34)tRNA^{Tyr} wesentlich für die diskutierten regulatorischen Funktionen bei der Synthese spezifischer Proteine sein: Da *D. discoideum* Queuin nicht selbst synthetisieren kann, kann er die Spiegel der Q-defizienten tRNAs während des Entwicklungszyklus (d.h. in Abwesenheit einer exogenen Quelle von Q) nicht durch eine einfache Nachmodifikation reduzieren. Ein Abbau dieser tRNAs könnte deshalb ein Mechanismus sein, durch den regulatorische Signale, die von (G34)tRNA^{Asp} und (G34)tRNA^{Tyr} gesetzt wurden, wieder abgeschaltet werden können.

LITERATUR

- Albani, M. (1979)
Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- Albani, M., Schmidt, W., Kersten, H., Geibel, K. und Lüderwald, I. (1976)
FEBS Lett. 70, 37-42
- Allison, S., Goh, S.H. und Hall, B.D. (1983)
Cell 34, 655-664
- Arnold, H.-H., Schmidt, W. und Kersten, H. (1975)
FEBS Lett. 52, 62-65
- Arnold, H.-H. und Ogilvie, A. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 343-349
- Balis, M.E. (1968)
in Antagonists and Nucleic Acids (Neuberger, A. und Tatum, E.L., Hrsg.) S. 123-161, North-Holland Publishing Company, Amsterdam
- Bergmann, J.E. und Lodish, H.F. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 11927-11937
- Bienz, M. und Kubli, E. (1981)
Nature 294, 188-192
- Björk, G.R. und Neidhardt, F.C. (1971)
Cancer Res. 31, 706-709
- Björk, G.R. und Neidhardt, F.C. (1975)
J. Bacteriol. 124, 99-111
- Bonner, W.M. und Laskey, R.A. (1974)
Eur. J. Biochem. 46, 83-88
- Borer, P.N., Dengler, B., Tinoco, I.jr. und Uhlenbeck, O.C. (1974)
J. Mol. Biol. 86, 843-853
- Bouadloun, F., Donner, D. und Kurland, C.G. (1983)
EMBO J. 2, 1351-1356
- Buck, M. und Griffiths, E. (1982)
Nucl. Acids Res. 10, 2609-2624
- Cozzone, A.J. (1981)
TIBS 6, 108-110
- Davanloo, P., Sprinzl, M., Watanabe, K., Albani, M. und Kersten, H. (1979)
Nucl. Acids Res. 6, 1571-1581
- Debenham, P.G., Pongs, O. und Travers, A.A. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 870-874
- Dingermann, Th. (1980)
Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- Dingermann, Th., Mach, M. und Kersten, H. (1979)
J. Gen. Microbiol. 115, 223-232
- Dingermann, Th., Pistel, F. und Kersten, H. (1980)
Eur. J. Biochem. 104, 33-40
- Dingermann, Th., Ogilvie, A., Pistel, F., Mühlhofer, W. und Kersten, H.
(1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 763-773

- Edelmann, P. und Gallant, J. (1977)
Cell, 10, 131-137
- Engelberg-Kulka, H., Dekel, L. und Israeli-Reches, M. (1981)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 1008-1015
- Erdmann, V.A., Appel, B., Digweed, M., Kluwe, D., Lorenz, S., Lück, A.,
Schreiber, A., Schuster, L. (1980) in Genetics and Evolution of RNA
Polymerase, tRNA and Ribosomes (Osawa, S., Ozeki, H., Uchida, H. und
Yura, T., Hrsg.) S. 553-563, Elsevier/North-Holland, Amsterdam
- Fournier, A., Chavancy, G. und Garel, J.P. (1976)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 1187-1194
- Fradin, A., Gruhl, H. und Feldmann, H. (1975)
FEBS Lett. 50, 185-189
- Fraenkel, D.G. und Neidhardt, F.C. (1961)
Biochim. Biophys. Acta 53, 96-110
- Gangloff, J., Keith, G., Ebel, J.P. und Dirheimer, G. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 259, 210-222
- Gassen, H.G. (1980)
Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 24, 57-82
- Gassen, H.G. (1982)
Angew. Chem. 94, 15-27
- Gauss, D.H. und Sprinzl, M. (1983)
Nucl. Acids Res. 11, r1-r54
- Gorenstein, D.G. und Goldfield, E.M. (1982)
Biochemistry 21, 5839-5849
- Grover, A., Sundharadas, G. und Talwar, G.P. (1979)
Eur. J. Biochem. 100, 477-481
- Gündüz, U. und Katze, J.R. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 109, 159-167
- Hansen, B.S., Vaughan, M.H. und Wang, L. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 3854-3857
- Harley, C.B., Pollard, J.W., Stanners, C.P. und Goldstein, S. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 10786-10794
- Harvey, R.J. (1973)
J. Bacteriol. 114, 309-322
- Hassur, S.M. und Whitlock, H.W.jr. (1974)
Anal. Biochem. 59, 162-164
- Hirsh, D. (1971)
J. Mol. Biol. 58, 439-458
- Hopfield, J.J. und Yamane, T. (1980)
in Ribosomes: Structure, Function and Genetics (Chambliss, G.,
Craven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L. und Nomura, M.,
Hrsg.) S. 585-596, University Park Press, Baltimore
- Hosbach, H.A. und Kubli, E. (1979)
Mech. Ageing Dev. 10, 141-149
- Jacobson, K.B. (1978)
Nucl. Acids Res. 5, 2391-2404

- Jacobson, K.B., Farkas, W.R. und Katze, J.R. (1981)
Nucl. Acids Res. 9, 2351-2366
- Jelenc, P.C. und Kurland, C.G. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 3174-3178
- Kanerva, P.A. und Maenpaae, P.H. (1981)
Acta Chem. Scand., Ser. B 35, 379-385
- Kasai, H., Kuchino, Y., Nihei, K. und Nishimura, S. (1975a)
Nucl. Acids Res. 2, 1931-1939
- Kasai, H., Ohashi, Z., Harada, F., Nishimura, S., Oppenheimer, N.J.,
Crain, P.F., Liehr, J.G., van Minden, D.L. und McCloskey, T.A. (1975b)
Biochemistry 14, 4198-4208
- Kasai, H., Nakanishi, K., Macfarlane, R.D., Torgerson, D.F., Ohashi, Z.,
McCloskey, T.A., Gross, H.J. und Nishimura, S. (1976)
J. Am. Chem. Soc. 98, 5044-5046
- Katze, J.R. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 527-535
- Katze, J.R. und Beck, W.T. (1980)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 313-319
- Katze, J.R. und Farkas, W.R. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 3271-3275
- Katze, J.R., Basile, B. und McCloskey, J.A. (1982)
Science 216, 55-56
- Kersten, H. (1984)
Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. (im Druck)
- Kersten, H., Sandig, L. und Arnold, H.-H. (1975)
FEBS Lett. 55, 57-60
- Kersten, H., Albani, M., Männlein, E., Praisler, R., Wurmbach, P. und
Nierhaus, K.H. (1981)
Eur. J. Biochem. 114, 451-456
- Kersten, H., Praisler, R., Männlein, E. und Schellberger, H. (1983)
15th FEBS Meeting, Brüssel, Abstr. S-08/MO-129, S. 243
- Kersten, H., Schachner, E., Dess, G., Anders, A., Nishimura, S. und
Shindo-Okada, N. (1984)
in Biochemical and Clinical Aspects of Pteridins (Wachter, H.,
Curtius, H.Ch. und Pflieger, W., Hrsg.) W. de Gruyter, Berlin,
New York (im Druck)
- Khym, J.X. (1975)
Clin. Chem. 21, 1245-1252
- Labuda, D. und Pörschke, D. (1980)
Biochemistry 19, 3799-3805
- Laemmli, U. (1970)
Nature 227, 680-685
- Landin, R.-M., Boissard, M. und Petrisant, G. (1979)
Nucl. Acids Res. 7, 1635-1648
- Lin, V.K., Farkas, W.R. und Agris, P.F. (1980)
Nucl. Acids Res. 8, 3481-3489

- Litt, M. und Howell-Litt, R. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 375-378
- Loftfield, R.B. (1963)
Biochem. J. 89, 82-92
- Loftfield, R.B. und Vanderjagt, D. (1972)
Biochem. J. 128, 1353-1356
- Loomis, W.F. (1975)
Dictyostelium discoideum, Academic Press, New York
- Loomis, W.F. (1982)
The Development of Dictyostelium discoideum, Academic Press, New York
- Mandel, C.R. und Borek, E. (1963)
Biochemistry 2, 555-560
- Männlein, E. (1983)
Dissertation der Universität Erlangen-Nürnberg
- Marcu, K.B. und Dudock, B.S. (1976)
Nature 261, 159-162
- Merril, C.R., Switzer, R.C. und van Keuren, M.L. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4335-4339
- Möller, A., Wild, U., Riesner, D. und Gassen, H.G. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 3266-3270
- Morse, D.E. und Morse, A.N.C. (1976)
J. Mol. Biol. 103, 209-226
- Murao, K., Ishikura, H., Albani, M. und Kersten, H. (1978)
Nucl. Acids Res. 5, 1273-1287
- Nakada, D. (1965)
Biochim. Biophys. Acta 103, 455-465
- Neidhardt, F.C. (1979)
Labormanual
- Neidhardt, F.C., Vaughn, V., Phillips, T.A. und Bloch, P.L. (1983)
Microbiol. Rev. 47, 231-284
- Nishikura, K. und DeRobertis, E.M. (1981)
J. Mol. Biol. 145, 405-420
- Nishimura, S. (1972)
Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 12, 49-85
- Nishimura, S. (1983)
Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 28, 31-75
- Noguchi, S., Nishimura, Y., Hirota, Y. und Nishimura, S. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 6544-6550
- Ny, T., Thomale, J., Hjalmarsson, K., Nass, G. und Björk, G.R. (1980)
Biochim. Biophys. Acta 607, 277-284
- O'Farrell (1975)
J. Biol. Chem. 250, 4007-4021
- O'Farrell (1978)
Cell 14, 545-557
- Okada, N. und Nishimura, S. (1977)
Nucl. Acids Res. 4, 2931-2937

- Okada, N. und Nishimura, S. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 3061-3066
- Okada, N., Shindo-Okada, N., Sato, S., Itoh, Y.H., Oda, K. und Nishimura
(1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 4247-4251
- Ott, G., Kersten, H. und Nishimura, S. (1982a)
FEBS Lett. 146, 311-314
- Ott, G., Praisler, R., Männlein, E. und Kersten, H. (1982b)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 884
- Ott, G. und Kersten, H. (1983)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1189
- Owenby, R.K., Stulberg, M.P. und Jacobson, K.B. (1979)
Mech. Ageing Dev. 11, 91-103
- Pajot, P. und Claisse, M.L. (1974)
Eur. J. Biochem. 49, 275-285
- Palatnik, C.M., Katz, E.R. und Brenner, M. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 694-703
- Parker, J., Pollard, J.W., Friesen, J.D. und Stanners, C.P. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 1091-1095
- Parker, J. und Friesen, J.D. (1980)
Molec. Gen. Genet. 177, 439-445
- Pingoud, A. und Block, W. (1981)
Eur. J. Biochem. 116, 631-634
- Pistel, F. (1982)
Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- Praisler, R. (1984)
Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- Praisler, R., Männlein, E., Richter, H., Ott, G. und Kersten, H. (1981)
Gemeinsame Tagung der Société de Chimie Biologique, der Gesellschaft für Biologische Chemie und der Société Suisse de Biochimie,
Strasbourg, Abstr. T.2.11
- Rahmsdorf, H.J. (1977)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 527-529
- Reyniers, J.P., Pleasants, J.R., Wostmann, B.S., Katze, J.R. und
Farkas, W.R. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 11591-11594
- Roe, B.A. und Tsen, H.-Y. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 3696-3700
- Roe, B.A., Chen, E.Y. und Tsen, H.-Y. (1976)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 1339-1347
- Roe, B.A., Stankiewicz, A.F., Rizi, H.L., Weisz, C., DiLauro, M.N.,
Pike, D., Chen, Ch.Y. und Chen, E.Y. (1979)
Nucl. Acids Res. 6, 673-688
- Schachner, E. (1981)
Diplomarbeit Universität Erlangen-Nürnberg
- Schachner, E. und Kersten, H. (1984)
J. Gen. Microbiol. (im Druck)

- Schachner, E., Aschhoff, H.-J. und Kersten, H. (1984)
Eur. J. Biochem. (im Druck)
- Schmidt, W. (1977)
Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- Schmidt, W., Arnold, H.-H. und Kersten, H. (1977a)
J. Bacteriol. 129, 15-21
- Schmidt, W., Kersten, H. und Schweiger, H.G. (1977b)
in Progress in Acetabularia Research (Woodcock, C.L.F., Hrsg.)
S. 39-43, Academic Press, New York
- Schofield, P. und Zamecnik, P.C. (1968)
Biochim. Biophys. Acta 155, 410-416
- Schwarz, U., Lührmann, R. und Gassen, H.G. (1974)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 807-814
- Schwarz, U., Menzel, H.M. und Gassen, H.G. (1976)
Biochemistry 15, 2484-2490
- Scott, W.A. und Tomkins, G.M. (1975)
in Methods in Enzymology (O'Malley, B.W. und Hardman, J.G., Hrsg.)
Bd. 40, S. 273-293, Academic Press, New York
- Sharp, St., DeFranco, D., Dingermann, Th., Farrell, P. und Söll, D. (1981)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6657-6661
- Shindo-Okada, N., Okada, N., Ohgi, T., Goto, T. und Nishimura, S. (1980)
Biochemistry 19, 395-400
- Shindo-Okada, N., Terada, M. und Nishimura, S. (1981)
Eur. J. Biochem. 115, 423-428
- Singhal, R.P. und Vakharia, V.N. (1983)
Nucl. Acids Res. 11, 4257-4272
- Singhal, R.P. und Kopper, R.A. (1981)
Feder. Proc. 40, 1646
- Singhal, R.P., Kopper, R.A., Nishimura, S. und Shindo-Okada, N. (1981)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 99, 120-126
- Smith, D. und McNamara, A. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 104, 1459-1463
- Spadaro, A., Spena, A., Santonastaso, V. und Donini, P. (1981)
Nature, 291, 256-258
- Sprinzl, M., Wagner, T., Lorenz, S. und Erdmann, V.A. (1976)
Biochemistry 15, 3031-3039
- Sussman, M. (1976)
in Methods in Cell Physiology (Prescott, D., Hrsg.) Bd. 2, S. 397-410,
Academic Press, New York
- Taylor, M.W., Granger, G.A., Buck, C.A. und Holland, J.J. (1967)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57, 1712-1719
- Travers, A. (1976)
Molec. Gen. Genet. 147, 225-235
- Umbarger, H.E. (1969)
in Current Topics in Cellular Regulation (Horecker, B.L. und
Stadtman, E.R., Hrsg.) Bd. 1, S. 57-77, Academic Press, New York

- Wagner, R. und Garret, R.A. (1979)
Eur. J. Biochem. 97, 615-621
- Walden, Th.L.jr., Howes, N. und Farkas, W.R. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 13218-13222
- Watanabe, S. (1972)
J. Mol. Biol. 67, 443-457
- Watts, D.J. und Ashworth, J.M. (1970)
Biochem. J. 119, 171-174
- Wosnick, M.A. und White, B.N. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 1131-1138
- Wosnick, M.A. und White, B.N. (1979)
Biochim. Biophys. Acta 561, 194-205
- Zubrod, E. (1982)
Diplomarbeit Universität Erlangen-Nürnberg
- Zubrod, E., Ott, G. und Kersten, W. (1983)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1236

Mein besonderer Dank gilt

Frau Prof. Dr. H. Kersten für die Anregung zu dieser Arbeit, die stets freundliche Unterstützung und die durch ständige Diskussionsbereitschaft mögliche intensive Betreuung;

Herrn Prof. Dr. W. Kersten für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und für die großzügige Förderung bei der Durchführung dieser Arbeit;

Herrn Prof. Dr. H.G. Gassen dafür, daß er sich freundlicherweise zur Begutachtung dieser Arbeit bereit erklärt hat;

Herrn Prof. Dr. G. Björk, Umea für die Überlassung der Mutantenstämme von E. coli;

Herrn Prof. Dr. S. Nishimura, Tokyo dafür, daß er uns synthetisches Queuin zur Verfügung gestellt hat;

Herrn Dr. H.J. Aschhoff und Fräulein I. Benz für die Bereitstellung der angereicherten E. coli-tRNA-Guanin-Transglycosylase;

allen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Frau Eva Zubrod, Herrn Dr. F. Pistel und Herrn Dr. Th. Dingermann, für die zahlreichen Anregungen und die hilfreichen Diskussionen.

LEBENS LAUF

Hans-Gisbert Ott

Persönliche Daten:

Geburtsdatum	26. April 1956
Geburtsort	Ansbach / Mfr.
Eltern	Hans Ott, Apotheker; Berta Ott, geb. Müller
Familienstand	verheiratet seit 27. März 1981 mit Martha Ott, geb. Hetzar, Apothekerin

Schul Ausbildung:

Sep. 1962 - Juli 1966	Volksschule Forth / Mfr.
Sep. 1966 - Juni 1974	Ohm-Gymnasium Erlangen
Juni 1974	Abitur

Studium:

Nov. 1974 - Nov. 1979	Pharmazie, Universität Erlangen - Nürnberg
Sep. 1977	1. Prüfungsabschnitt
Nov. 1979	2. Prüfungsabschnitt
Dez. 1979 - Mai 1980	Praktikum in der Schwabach-Apotheke, 8501 Eckental
Juni 1980 - Nov. 1980	Praktikum am Institut für Physiologische Chemie der Universität Erlangen - Nürnberg
Dez. 1980	3. Prüfungsabschnitt
Jan. 1981	Approbation als Apotheker
Dez. 1980 - Feb. 1984	Dissertation bei Frau Prof. Dr. H. Kersten, Institut für Physiologische Chemie der Univer- sität Erlangen - Nürnberg

Druck: Copy Center 2000
Obere Karlstraße 30
8520 Erlangen